

The Resource and Genetic Diversity
of *Camellia meiocarpa* Hu.

小果油茶资源与 遗传多样性研究

姚小华 黄勇 著

Edited by Yao Xiaohua
Huang Yong



科学出版社

小果油茶资源与遗传多样性研究

The Resource and Genetic Diversity of
Camellia meiocarpa Hu.

姚小华 黄 勇 著

Edited by Yao Xiaohua Huang Yong

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

遗传多样性是生物多样性的核心,是物种长期进化的产物。探究小果油茶的遗传多样性现状,可以为小果油茶的资源保护和利用策略、关键经济性状的确立及特异育种区划提供参考依据。同时通过两物种遗传多样性比较、种间遗传分化及亲缘关系分析可以为小果油茶分类地位的确立打下良好基础。全书分为研究背景及国内外发展述评、小果油茶表型多样性、含油率及脂肪酸多样性分析和评价、基于 SRAR 标记遗传多样性分析、小果油茶遗传多样性评价及资源利用、种间杂交渐渗及小果油茶优良种质资源筛选与综合评价等 7 个章节。

本书可供经济林育种和高校相关专业的师生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

小果油茶资源与遗传多样性研究/姚小华,黄勇著. —北京:科学出版社, 2013. 6

ISBN 978-7-03-037924-5

I. ①小… II. ①姚… ②黄… III. ①油茶-种质资源-研究 ②油茶-遗传-生物多样性-研究 IV. ①S794.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 134557 号

责任编辑:张会格 王 好 / 责任校对:桂伟利
责任印制:钱玉芬 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 6 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2013 年 6 月第一次印刷 印张: 11 1/4 插页: 4

字数: 236 000

定价: 60.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

遗传多样性是生物多样性的核心,是物种长期进化的产物,物种的稳定性和进化潜力依赖其遗传多样性,而物种的经济和生态价值也有赖于其特定的基因组成(沈浩和刘登义,2001),对一定区域内特有物种遗传多样性和群体遗传结构的研究,有助于了解物种进化历史及适应潜力,从而为制定科学的保护及利用策略提供了重要的依据。杂交渐渗对物种的形成及进化具有明显地推动作用,而这种作用在同域分布的物种中体现更加明显,可能是分布区的重叠使得不同物种更容易发生种间杂交渐渗,且杂交后代的遗传变异,又使得同域分布区成为一个天然的杂交带,很大程度地促进了新的物种形成及进化(Rieseberg et al., 2003; Mallet, 2007)。

油茶是中国南方非常重要的木本油料作物。它具有历史悠久、分布地区广、栽培面积大、用途广泛等特点(庄瑞林等,2008)。且和油棕、油橄榄、椰子一起被称为世界四大木本油料食用植物,具备很高的经济利用价值(胡芳名等,2006)。小果油茶(*Camellia meiocarpa* Hu.)的年产量及分布面积均在山茶属中排第二位,仅次于普通油茶(*Camellia oleifera* Abel.)。小果油茶与普通油茶的形态特征相比较,其明显区别在于果小、芽小、叶小且芽苞片没有毛(李振纪,1981;庄瑞林等,2008)。小果油茶虽然果实较小,但对比主栽物种普通油茶,具有果皮较薄,含油率和出籽率较高、适应性和抗病性较强、居群效应好及产量相对稳定等优点,因此如何充分利用这些优良特异的性状是摆在油茶育种研究人员面前的一个重要课题。

本研究在由“十一五”国家科技支撑计划项目(2009BADB1B01、2009BADA8B04)、中国林业科学研究院公益性科研基金专项(CAFYBB2008005)、中国林业科学研究院亚热带林业研究所公益性科研基金专项(RISF6804)、福建省自然科学基金项目(2010J01088)、福建省林业厅林木种苗科技攻关项目[闽林科(2009)4号]、国家林业局南方山地用材林培育重点实验室及福建省森林培育与林产品加工利用重点实验室共同资助下,在对小果油茶种质资源及与普通油茶重叠分布区全面调查的基础上,分别对小果油茶的遗传多样性及与普通油茶杂交渐渗进行研究,全书分为小果油茶遗传多样性及杂交渐渗研究概述、表型多样性、含油率及脂肪酸多样性分析和评价、基于SRAR标记遗传多样性分析、小果油茶遗传多样性评价及资源利用、种间杂交渐渗及小果油茶优良种质资源筛选与综合评价等7个章节。

本研究野外观测得到广西、江西、福建、贵州、湖南、湖北、浙江及广东等省(区)

各调查地点林业部门大力支持和帮助,对此,致以深切的谢意。研究过程中涉及资源与分布、调查方法及具体操作等方面,得到了中国林业科学研究院亚热带林业研究所高继银研究员和油茶研究专家庄瑞林先生的指导。并得到广西壮族自治区林业科学研究院马锦林副院长、江西省林业科学院徐林初研究员、广东省林业厅推广站站长王登峰、宜春市袁州区油茶局李铁民副局长、广西壮族自治区龙胜各族自治县林业局营林股股长廖玉明和副股长代学忠、广西壮族自治区三江侗族自治县林业局侯立英高级工程师、广西融水苗族自治县营林管理站站长韦成略、贵州黎平县林业局推广站站长杨臣超站长和姚渊工程师、贵州黎平东风林场杨萍工程师、江西省定南县林业局周祺南和郑志勇工程师、江西省江西黎川林业局连需龙高级工程师、湖北林业科学研究院陈军勇高级工程师、湖北省阳新县林业局副局长安建新和明延柏工程师、广东省乳源县林业局徐武和侯祝华高级工程师、湖南省怀化市林业局周晓勤高级工程师和通道县林业局副局长陆奇勇、湖南省平江县林业局邹武高级工程师、浙江仙居林业局彭加龙高级工程师、福建省清流县永得里食品有限公司薛贤慈、闽清县白岩山油茶公司何希斌、福建省漳浦县林业局张苏玮和黄小月高级工程师、福建省光泽县李红斌副局长和林峰工程师、福建建宁林业局林业科技推广中心主任周立华、福建省浦城县林业局包剑彪副局长、黄仁俊高级工程师,以及浦城县林业科技推广中心主任江淑平等的支持。

本书在实验研究、实验条件等方面得到了国家油茶科学中心种质创新与利用实验室、国家林业局油茶工程技术研究中心、中国林业科学研究院油茶研究中心、中国林业科学研究院亚热带林业研究所木本油料实验室、国家林业局南方山地用材林培育重点实验室及福建省森林培育与林产品加工利用重点实验室的支持。全国油茶技术协作组许多成员单位在本研究过程中给予实验、调查工作大力支持。在实验过程、数据整理、文字编写等方面也得到了中国林业科学研究院亚热带林业研究所木本油料团队王开良副研究员、任华东高级工程师、李生副研究员、林萍、曹永庆、常君、龙伟等科研团队成员和周长富、赵靖明、孔文娟等博士、硕士研究生,以及福建省林业科学研究院李志真教授级高级工程师和谢一青高级工程师的支持。

本书的出版,本着与油茶研究专家、技术人员和生产单位开展交流为目的。由于时间仓促,对本书存在的不当之处,敬请广大读者及专家批评指正。

姚小华 黄勇

2012年12月

目 录

前言

1 研究背景及国内外发展述评	1
1.1 小果油茶的命名来源	2
1.2 小果油茶的生物学特性	3
1.3 小果油茶研究现状	3
1.4 小果油茶分布及发展概况	4
1.5 形态学标记在木本植物遗传多样性中的应用	5
1.6 DNA 分子标记及其在木本植物和油茶遗传多样性及山茶属分类和鉴定上的应用	5
1.7 SSR 分子标记及其在木本植物遗传多样性上的应用	7
1.8 SRAP 分子标记及其在木本植物遗传多样性中的应用	8
1.9 国内外植物(木本)杂交渐渗研究概况	9
2 小果油茶表型多样性研究	11
2.1 实验材料与方法	11
2.1.1 实验材料	11
2.1.2 实验方法	11
2.2 结果与分析	16
2.2.1 小果油茶种实性状表型多样性分析	16
2.2.2 小果油茶叶表型性状多样性分析	34
2.2.3 小果油茶花表型性状多样性分析	49
2.2.4 小果油茶表型性状多样性分析	61
2.3 小结与讨论	70
3 小果油茶不同居群种仁含油率及脂肪酸组分多样性分析及评价	75
3.1 实验材料与方法	75
3.1.1 实验材料	75
3.1.2 实验方法	75
3.2 结果与分析	77
3.2.1 小果油茶种仁含油率及脂肪酸变异特征	77
3.2.2 小果油茶种仁含油率及脂肪酸居群间表型分化	81
3.2.3 小果油茶脂肪酸性状与地理生态因子的相关分析	81

3.2.4	小果油茶不同居群含油率及脂肪酸聚类分析	83
3.2.5	小果油茶含油率及脂肪酸地理变异趋势面分析	83
3.2.6	小果油茶含油率及脂肪酸数量性状频率分布	85
3.2.7	小果油茶含油率及脂肪酸多样性指数比较	89
3.2.8	小果油茶含油率及脂肪酸多样性指数与地理生态因子的相关分析	89
3.2.9	小果油茶含油率及脂肪酸多样性指数地理变异趋势面分析	90
3.2.10	小果油茶不同居群品质水平评价	92
3.3	小结	94
4	基于 SRAP 标记的小果油茶遗传多样性分析	95
4.1	材料与方法	95
4.1.1	材料	95
4.1.2	实验方法	97
4.2	结果与分析	101
4.2.1	小果油茶基因组 DNA 紫外检测结果	101
4.2.2	小果油茶 SRAP 引物扩增多态性分析	101
4.2.3	小果油茶居群遗传多样性分析	103
4.2.4	居群的遗传分化与基因流	104
4.2.5	居群遗传变异 AMOVA 分析	105
4.2.6	小果油茶的遗传距离和聚类分析	105
4.3	小结与讨论	108
4.3.1	基于 SRAP 分子标记技术评价小果油茶遗传多样性的可行性	108
4.3.2	小果油茶居群遗传多样性分析及居群遗传分化	108
4.3.3	小果油茶的遗传距离和聚类分析	109
5	小果油茶遗传多样性评价及资源利用	110
5.1	小果油茶关键经济性状评价	110
5.2	特异优质育种性状的确立及小果油茶特异优质育种资源区划	110
5.3	小果油茶种质资源保育	113
5.4	展望	114
6	小果油茶与同域分布的普通油茶杂交渐渗研究	116
6.1	材料与方法	116
6.1.1	材料	116
6.1.2	DNA 的提取	118
6.1.3	DNA 浓度和质量的琼脂糖电泳检测	118
6.1.4	聚丙烯酰胺凝胶电泳	118
6.1.5	凝胶银染	118

6.1.6	扩增反应体系及程序	118
6.1.7	SSR 引物来源及筛选	118
6.1.8	统计方法	118
6.2	结果与分析	120
6.2.1	小果油茶 SSR 引物扩增多态性分析	120
6.2.2	两物种等位基因的物种特异性及共有基因频率	120
6.2.3	小果油茶和普通油茶遗传多样性分析	121
6.2.4	小果油茶和普通油茶种内遗传分化及基因流	121
6.2.5	同域分布的小果油茶和普通油茶居群间遗传分化	125
6.2.6	聚类分析	126
6.3	小结	128
6.4	关于小果油茶分类地位的探讨	129
7	小果油茶优良种质资源筛选与综合评价	132
7.1	材料与方法	132
7.1.1	优树选择标准	132
7.1.2	优树选择方法	132
7.1.3	通径分析方法	133
7.1.4	初选优树的模糊聚类分析	134
7.2	结果与分析	135
7.2.1	小果油茶初选优树各性状因子对产量的通径分析结果	135
7.2.2	模糊聚类分析结果	136
7.2.3	初选优树的综合评价结果	138
7.3	优良单株简介	143
7.4	结论与讨论	145
本书小结		146
Abstract		149
参考文献		154
彩图		

1 研究背景及国内外发展述评

油茶是中国南方非常重要的木本油料作物。它具有历史悠久、分布地区广、栽培面积大、用途广泛等特点(庄瑞林等,2008)。且和油棕、油橄榄、椰子一起被称为世界四大木本油料食用植物,具备很高的经济利用价值(胡芳名等,2006)。油茶籽所提取的茶油被认为是可以和橄榄油相媲美的绿色优质食用油,所含的不饱和脂肪酸含量很高,可达80%以上,且不含黄曲霉素等物质,而这些物质被认为可能会对人体健康造成危害。此外还含有诸多对人体有益的茶多酚、山茶皂甙及维生素E等物质,其中茶多酚和茶皂素是茶油所特有的。茶多酚可通过阻止物质的过氧化反应,来延长茶油保存期、提高人体的抗衰老和抗肿瘤的能力。山茶甙具有强心剂的作用,山茶皂甙具有溶血栓的作用。所以联合国粮农组织已经将茶油作为重点推介的保健型的高级食用油(欧阳嘉等,1997;丛玲美,2007)。

2009年之前,整个中国的油茶种植面积已超过4500万亩^①,每年生产油茶食用油总量约为27万t。为了推动油茶产业发展,2009年的中央一号文件就明确提出了“积极发展油茶及核桃等木本油料作物”。《国家粮食安全中长期规划纲要(2008—2020年)》也就木本粮油产业的发展提出明确的规划。国家林业局也在2006~2008年分别在江西和湖南召开全国油茶发展现场会,并出台了一系列关于加快油茶发展的纲要(姚小华,2010)。因此,在国家利好政策不断出台的背景下,油茶也迎来了非常难得的发展机会,各级地方政府及广大林农对发展油茶的积极性急剧上涨,油茶生产也将成为农民增收致富的渠道之一、现代化林业生产新亮点和山区丘陵综合开发的一个突破口。

小果油茶(*Camellia meiocarpa* Hu.)的年产量及分布面积均在山茶属中排第二位,仅次于普通油茶(*Camellia oleifera* Abel.)。小果油茶与普通油茶的形态特征相比较,其明显区别在于果小、芽小、叶小且芽苞片没有毛(李振纪,1981;庄瑞林等,2008)。小果油茶虽然果实较小,但对比主栽物种普通油茶,具有果皮较薄,含油率和出籽率较高、适应性和抗病性较强、居群效应好及产量相对稳定等优点,因此如何充分利用这些优良特异的性状是摆在油茶育种研究工作人员面前的一个重要课题。

目前,小果油茶是野生和半野生及栽培三种混合状态,它是异花授粉树种,通过虫媒传粉而实现在不同个体或居群间的随机广泛地天然杂交而繁殖后代,因此

① 1亩≈666.67m²,后同

群内及群间变异很大,遗传基础十分广泛,从中选育出高产、优质及高抗等优良性状的优良种质的可能性较大。现有研究认为生物遗传多样性大小是育种工作的关键所在,也是开展育种工作的前提和基础(余跃辉,2005),因此通过对小果油茶不同居群的遗传多样性分析,可以摸清小果油茶遗传多样性状况,揭示其居群遗传结构和遗传关系、居群与生态地理因子之间的相关性及基因流动方向,对开展小果油茶良种选育具有重要的意义。可见,对小果油茶遗传多样性的研究有着重要的理论和实践意义。

目前,小果油茶与普通油茶在很多地区存在同域分布的现象,它们之间存在大量疑似种间杂交种,两物种之间是否存在种间基因渐渗且这些疑似杂交种是否两物种基因渐渗的结果,至今未见报道。

因此,本研究以全分布区的小果油茶和较有代表性 5 个同域分布小果油茶及普通油茶居群为研究对象,通过对小果油茶表型性状、含油率及脂肪酸成分、DNA 分子水平分析小果油茶不同居群间及居群内遗传多样性和亲缘关系,以及两物种种间杂交渐渗进行研究,为有效保护小果油茶种质资源及品种选育提供了理论依据。

1.1 小果油茶的命名来源

我国著名的植物学家,植物分类学的奠基人胡先骕老先生于 1957 年把小果油茶定为一个新物种,因其果实多在寒露季节成熟,所以他又将小果油茶称为寒露油茶,其拉丁文为 *Camellia meiocarpa* Hu. (胡先骕,1957)。中山大学植物学教授张宏达把小果油茶定为油茶的变种,由于其籽大多数为单籽,因此称其为单籽油茶,拉丁文为 *Camellia oleifera* var. *monosperma* Chang,其原变种为普通油茶(*Camellia oleifera* Abel.) (张宏达,1992,1998)。闵天禄(1999)对广西植物园所栽培的小果油茶进行观察及鉴别,认为小果油茶不是独立种,有可能是栽培条件下的变异。

目前,油茶研究工作者基本上采用胡先骕的分类方法(李振纪,1981;熊年康等,1987;胡芳名等,2006;庄瑞林等,2008;姚小华,2009,2010),认为小果油茶(也有称小叶油茶)在形态特征上与普通油茶有非常明显的区别,小果油茶与普通油茶的形态特征相比较,明显的区别在于小果油茶果小、叶小、芽小,芽苞片没有毛,因此许多经济林栽培专家将其作为山茶属中的一个物种对待。与张宏达和闵天禄所观察的单籽油茶不同之处在于,由于单籽油茶和普通油茶重叠分布区较大,长期分化过程中存在自然杂交可能,导致其果实不仅只有单籽,且 2 或 3 颗籽也很常见,因此他们将这一类果实小于普通油茶、皮薄、叶小的这一类油茶统称为小果油茶。从笔者在本次全分布区调查情况来看,其果实类型繁多,果实种子数主要是 1~3

颗,甚至也有4颗以上,因此为了通俗起见及贴近现状,本文将采取油茶研究者的命名方法,将其统一命名为小果油茶(*Camellia meiocarpa* Hu.)。

1.2 小果油茶的生物学特性

小果油茶多为小乔木,嫩枝具有细毛,节间较短,叶片小且多,分枝角度较小,全株枝多且叶密,可见小果油茶和普通油茶存在明显不同。蒴果通常为球形、桃形、橄榄形及少量其他类型,果皮较薄,单果1~3粒种子,叶缘锯齿较普通油茶浅;腋芽苞片和顶芽是浅绿色或绿色,长0.5~0.7cm;叶形为椭圆形居多,且较小,长2.5~5.5cm;一般10月下旬至11月中旬始花,花为白色,花冠较为平展,花瓣5~8枚,呈倒披针形,花瓣和雄蕊相分离而脱落,雄蕊可长期留存;花柱头略微膨大,子房为3~5室,披褐色短毛;小果油茶和普通油茶的外部形态特征相比较,可以看出两者明显的区别在于果小、芽小,叶小且芽苞片无毛(庄瑞林等,2008;姚小华,2009)。

小果油茶在不同地区,其物候的差别相当明显。小果油茶蒴果一般于10月上旬、中下旬及11月上旬开始成熟,但在不同地方成熟的时间相差较大。江西、湖南北部及福建西北部多为10月上旬成熟,称为寒露籽;在广西和福建中南部为10月中旬或下旬成熟,一般称为霜降籽;而在福建中部及广东地区为11月上旬成熟,称为立冬籽。小果油茶的果实大小差异很大,不同居群、单株及甚至在同一单株上的不同果实之间都有较大差别。

在福建地区把小果油茶分为三种类型。大果俗称为‘龙眼花’,为优良的农家品种,果径为2.0~3.6cm,接近普通油茶的小果类型,单果籽数一般为2~4个,目前是小果油茶中的主栽品种;中果为1.0~2.0cm,俗称为羊屎茶,单果籽数一般为1~2个,偶见3个;小果类型为1.0cm以下,俗称珍珠茶,单果籽数一般为1个。

小果油茶花期在不同地方差异也很大,寒露籽类型在10月上旬始花,这时为零星开花,出现花果同株,也就是“抱子怀胎”的景象,一般采果期结束后,开始进入盛花期,盛花期时间为15天左右,整个花期维持一个月左右的时间。霜降籽类型一般10月中旬或下旬始花,11月中下旬花期结束。立冬籽类型11月上旬始花,12月上旬花期结束。

1.3 小果油茶研究现状

小果油茶是我国特有的油料作物,其栽培面积和年产量仅次于普通油茶,为全国第二位。关于小果油茶育种方面,目前国外未有报道,国内相关文献也很少,仅见周盛等(2001)在小果油茶、普通油茶及越南油茶三物种种间的杂交实验中,作出

小果油茶与普通油茶及越南油茶杂交可育的结论,且可育成优质高产品种的机会很大。庄瑞林等(1991)对 13 个油茶物种进行种间杂交实验,从 41 个杂交组合的孕性不同可看出互相之间亲和力的高低,结果发现普通油茶×小果油茶杂交组合的亲和力最高,正交(坐果率 43%~80%)及反交(坐果率 51%~68.75%)。在育种方面,全国油茶协作组从各省区所上报的农家品种中,选出了‘龙眼茶’和‘江西宜春白皮中子’作为优良农家品种,它们同属于小果油茶系列,分别为福建省林业科学研究所和江西宜春市油茶场选出。福建‘龙眼茶’,因形似龙眼而得名,果径 2.0~3.6cm,比较高产稳产,果皮薄,出籽率高达 60%~70%,出油率高,油质好,酸价较低,抗炭疽病及抗风力也较强,是长期人工选择出来的优良类型(熊年康等,1987;章浩白,1993)。^①‘宜春白皮中子’,虽然果小采摘存在一定困难,但由于其适应性强,出油率高,所以一直受到江西宜春一带林农的欢迎,成为当地的主栽品种。还有贵州林业科学研究院在贵州黎平选育出的‘大宝油茶’也是小果油茶,它是优良的农家品种,产量高且稳产,抗病虫能力强,出籽率、出仁率、出油率均高,油质优良,其中的‘白珍珠’和‘黄珍珠’两个类型更为优良(李振纪,1981;庄瑞林等,2008)。

1.4 小果油茶分布及发展概况

小果油茶主要分布在中亚热带 600m 以下低海拔地区,此地区冬无严寒且空气湿润。从本次小果油茶种质资源调查状况来看,小果油茶目前主要分布在福建西北及中南部、江西中南部、湖南东北部及西南部、广西东北部、湖北阳新、贵州东南、广东乳源及浙江仙居。福建分布面积最大,其次为江西。小果油茶的发展现状不容乐观,在许多地方被严重破坏。西南地区的广西阳朔、临桂等地一直延伸至湖南的道县和永州(庄瑞林等,2008),大约一万多平方千米,这一地区以前为小果油茶的重要产区,但由于人为破坏严重,这个地区现已没有小果油茶分布了;湖南会同、靖州等地及广东的乐昌、平远、焦岭及饶平等地,这些地方本来也是小果油茶的分布区之一,历史上记载其分布有一定的面积,同样也是人为破坏严重,现也已经没有小果油茶分布了。

另外,小果油茶作为全国分布面积排行第二的山茶属物种,在各地发展状况也很不平衡。在有些地方,由于未能引起充分的重视,小果油茶林分杂草丛生、产量极低,基本上是自生自灭的状况。但在福建闽清、尤溪、仙游及永泰等地,广大林农及当地政府对小果油茶的发展较为重视,发展状况良好,出现了大量的高产林分,有些林分的亩产油量甚至超过 50kg,经济效益相当显著。

1.5 形态学标记在木本植物遗传多样性中的应用

形态学标记为遗传物质的直接表达结果,形态学数据所涵盖的植物自身遗传变异和环境共同作用的结果(Domingo et al., 2004; 周延清等, 2008)。早期的植物遗传多样性研究往往是通过表型或形态学性状来进行。如油茶的果实、种子、花及叶性状和株高等。一般可利用的表型性状主要有两种:一种是能够在后代中明确分类的质量性状,它们是由单或寡基因所决定的;另一种是在杂种世代中表现出连续分布的数量性状,它们是由多个基因所决定的。形态学水平上遗传变异的研究具有简单、易行且快速等优点,所以长期以来在各类植物遗传变异研究中得到持续应用(文亚峰等, 2006; 李际红等, 2007; 贺熙勇等, 2010)。表型多样性是遗传多样性与生境异质化共同作用的综合体现,生物居群在不同生境下的表型变异一直是生物系统学和生物多样性的重要研究内容(李巧明等, 2003)。一个植物居群遗传多样性越高,其对环境变化的适应能力也就越强,因而越容易扩宽分布范围及渗透到其他生态环境中(顾万春, 1998; 王磊等, 2009)。通过科学采样及应用正确的数学统计方法,把植物表型性状作为遗传标记,通常能够较为有效地揭示不同居群的遗传结构和变异大小,达到摸清居群遗传多样性状况的目的。

种实、花及叶片的表型变异是植物遗传变异的重要特征之一,而这些表型性状的变异通常具有适应与进化上的意义(Lee et al., 1990; Rocas et al., 1997; 曾杰, 2002; 林波和刘庆, 2008; 邓云等, 2010),因此在植物遗传多样性研究中一直拥有重要的地位,并且随着遗传多样性的进一步深入研究发展,表型性状的遗传多样性研究在国内外也越来越受到各类植物研究专家的重视(Bagchi et al., 1990; King et al., 1998; Atasay, 1996; Kang and Lindgren, 1999; 李文英和顾万春, 2005; 王赞等, 2005; 赵冰和张启翔, 2007; 王静等, 2010)。

1.6 DNA 分子标记及其在木本植物和油茶遗传多样性及山茶属分类和鉴定上的应用

自 20 世纪 80 年代以来,随着分子生物学技术的研究发展,DNA 分子标记技术诞生,它能够检测到 DNA 碱基序列上的变异。遗传多样性是指生物所具有的各种遗传信息的总和,即生物遗传基因多样性,每个物种及生物个体都具有大量的遗传基因,所以它们可看被作是一个基因库(Rieger et al., 1991; 王艳梅, 2008; Han et al., 2008)。利用 DNA 水平上的差异来分析植物居群遗传结构和遗传多样性,对于正确评价植物种质资源的遗传多样性,从而科学地制定育种方案具有十分重要的意义(周延清等, 2008; 龙青姨等, 2010)。

DNA 分子水平上的变异包括点突变和大片段突变。基因突变(gene mutation)包括碱基的插入、缺失、转换和颠换 4 种基本的方式,它可产生基因功能的丧失或功能获得的遗传后果,从而产生遗传多样性(张玉静,2002)。点突变(point mutation)指单个碱基的改变,包括错义突变、移码突变及沉默突变,点突变对于所编码的蛋白质的生物学活性具有各种不同的影响;大片段突变(gross mutation)是指较长的 DNA 序列的改变,包括缺失突变、插入突变及重排,它通常导致所编码的蛋白质的生物活性完全丧失(Primrose,2006)。

大量研究表明,DNA 分子标记鉴别生物遗传多样性是非常有效的技术手段(Kim and Ward,2000;Ahmad,2002,Ahmad et al.,2008)。DNA 分子标记不但应用到木本植物居群遗传多样性(Hudson,1993;Fabbri,1995;Wachira et al.,1995;Jia et al.,2000;罗建勋和顾万春,2004;刘威生,2005;刘丹等,2006),而且在木本植物居群遗传结构分析研究中也得到应用(Ge et al.,1998;Cervera et al.,2000;李建民等,2002;何承忠,2005;周连第,2005;谷俊涛,2006;徐刚标等,2007;刘军等,2008)。

DNA 分子标记在油茶中也得到应用,张云(2003)应用 RAPD 标记技术,分析了‘闽杂优 1’等 32 个油茶品系和 10 个龙眼茶的遗传多样性,以及‘闽杂优 1’等 32 个品系的单株结实量和果油率等遗传性状与 RAPD 分子标记的相关性,结果表明油茶果油率与 RAPD 标记某些基因可能有连锁关系,各品系的单株结实量却与 RAPD 标记之间没有明显相关关系;张国武等(2007)对 10 个优良油茶无性系(长林系列)进行遗传多样性分析,较准确地进行了各优良无性系的分子鉴别;黄永芳等(2006)利用 RAPD 技术对 90 份油茶种质进行遗传多样性分析,鉴别了它们的亲缘关系;王保明等(2008)应用 ISSR 分子标记对包括‘湘林系列’、‘岑软’、‘无性系’、‘赣无’、‘东风’、‘赣兴’及‘赣抚’在内的 23 个无性系进行遗传多样性分析,为油茶无性系检测、亲缘关系区分及种质资源利用,从 DNA 水平上提供了有效证据。

与此同时,利用 DNA 标记技术对山茶组分类上的研究也开始出现。唐绍清等(1998)利用 RAPD 技术对金花茶(*Camellia nitidissima* Chi)及其 5 个近缘种和 2 个变种进行分析,从 DNA 分子水平上较好地地区分对这些近缘种及变种亲缘关系。谭晓风等(2005)用 RAPD 对山茶属植物的油茶组与金花茶组进行分子分类,实验结果把油茶组 5 种植物分为三大类及金花茶组 20 种植物分为四大类,这种分类结果和张宏达分类系统大致相同。并对一些差异很小的物种提出了合并建议。邓白罗等(2006)对山茶属红山茶组 29 种植物进行 RAPD 分析及分类,为红山茶组植物起源与进化的研究及品种选育提供了非常有价值的资料。李铁柱等(2009)通过 ISSR 分子标记技术对四倍体和二倍体油茶进行比较与鉴定。

为了探讨山茶属茶亚属(*Camellia* Subgen. *Thea*) 超长柄茶组(Sect. *Longissima*)、金花茶组(Sect. *Chrysantha*) 和长柄山茶(Sect. *Longipedicellata*) 在系统上的位置及亲缘关系,方伟等(2010)对它们的叶绿体 DNA 片段进行测序,且对这些序列进行联合矩阵分析,较为成功地对这 3 个茶组进行了系统学的分类。

1.7 SSR 分子标记及其在本本植物遗传多样性上的应用

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)亦称微卫星(microsatellite),其长度一般较短,在 100bp 以内。SSR 分子标记为共显性标记,能鉴别杂合体与纯合体且标记数量丰富,能够覆盖整个基因组(Powell et al., 1996; 徐刚标, 2009)。SSR 分子标记的突变率很高,会产生很多等位基因,造成了它的高度多态性,根本原因来源于其串联数目的不同(周延清等, 2008),因此比起限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)及随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)等其他标记更具多态性。

虽然 SSR 分子标记有很多优点,但 SSR 两侧引物具有物种的特异性,需要克隆及测定重复序列两端序列信息,因此其引物的研发及检测费用较高(徐刚标, 2009)。自从 SSR 分子标记技术诞生以来,在植物研究中得到广泛应用,特别是越来越多地运用在本本植物的遗传多样性、种质资源鉴定、系谱及进化等方面。

SSR 分子标记技术在果树的种质资源遗传多样性方面运用较多。Fang 和 Roose(1997)利用 SSR 分子标记技术对柑橘近缘种进行种质资源鉴定。俞明亮等(2004)对桃的 6 个种和扁桃较为成功地进行 SSR 鉴定。Sim 等(2006)研究了荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.) SSR 分子标记在近缘种山荔枝(*Nephelium ramboutanake* L.)上的引物通用性,结果发现有 12 对引物在两近缘种中是可以通用的。高源等(2007)运用 SSR 分子标记技术对 59 份苹果属材料进行遗传多样性分析,聚类结果将全部样品分成三大类,即栽培品种、地方品种和新疆的野生种,为苹果属植物的分类系统提供科学证据。曾淇等(2010)运用 SSR 分子标记技术对 46 份荔枝材料种质遗传多样性分析,发现它们的亲缘关系较为接近,且淮枝(广东)与淮枝(海南)有可能为同名异物品种。耿攀等(2010)用 SSR 分子标记分析柿属种质资源的遗传多样性,且对 7 个柿种或变种的 48 份材料较好地进行聚类。此外 SSR 分子标记技术在杏仁(Ma et al., 2004)、核桃(Dang et al., 2005)、枳属(龚桂芝等, 2008)及杏(Zhebentyayeva et al., 2003; 张淑青等, 2010)等其他果树遗传多样性评估中得到应用。

SSR 分子标记技术还运用于果树的基因定位方面,宋伟等(2010a, 2010b)在梨果实形状及果皮褐色性状上进行 SSR 分子标记及定位,证明了 SSR 标记技术

可在育种实践中作为辅助选择工具而得以应用。

近年来,SSR 分子标记技术在其他木本植物上的应用也较为广泛,李世峰等(2006)运用 SSR 分子标记技术对美洲黑杨 11 个半同胞家系的遗传变异进行研究,为杨树育种研究工作提供较有价值的参考依据。刘军等(2008,2009)利用 8 对微卫星标记在空间自相关上分析了毛红椿天然居群的空间遗传结构,探究了该物种的进化过程和产生濒危的机制。

SSR 分子标记技术在山茶属茶树中也得到了应用。王丽鸳等(2009)利用 SSR 分子标记分析西湖龙井居群的遗传多样性,为有效地保护和利用茶树地方品种提供了科学的依据。王丽鸳等(2009)用 50 对 SSR 引物对 41 份茶组资源进行扩增,较好地地区分了茶组中的 12 个物种的亲缘关系。Ohsako 等(2008)用 6 个 SSR 对茶组的 9 个绿茶居群进行扩增,发现它们亲缘关系很高,共祖率很高。

1.8 SRAP 分子标记及其在木本植物遗传多样性中的应用

目前,木本植物中应用较多的分子标记主要有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、ISSR 等,但它们却都存在着一些问题。RAPD 稳定性差,不易重复;SSR 引物开发成本很高,且费工费时(Li et al.,2001);AFLPs 步骤较为复杂,且经常会出现假阳性(Vos et al.,1995);ISSR 在处理计算杂合度、交配系统及父系分析等问题效果不佳(周延清等,2008)。

2001 年,美国加州大学的 Li 和 Quiros 博士在芸薹属作物开发出来的一种基于 PCR 的新型分子标记技术——SRAP(sequence-related amplified polymorphism),又称为相关序列扩增多态性,该标记也是一种基于简单 PCR 新的标记系统,它主要是通过特的引物设计可读框(open reading frame,ORF)进行扩增,引物由核心序列和 3 个选择性碱基组成,其中核心序列分为非特异性填充序列和特异序列两部分(Li and Quiros,2001;周延清等,2008)。

SRAP 分子标记技术在植物遗传多样性分析及分类鉴定方面运用非常广泛(Ferriol et al.,2003),特别是农作物上尤为突出,目前已在甜瓜(Ferriol et al.,2003)、莲藕(刘月光等,2006)、棉花(李驰等,2007)、西瓜(李严和张春庆,2005)、番茄(Ruiz et al.,2005)、花生(王传堂等,2005;任小平等,2009)、黄瓜(李丽等,2006)、芝麻(孙建等,2009)、木瓜(王明明等,2010)及木薯(齐兰等,2010)等农作物中得到应用。

近年来,SRAP 分子标记技术在木本植物遗传多样性方面的运用也越来越多。Guo 和 Zheng(2006)运用 SRAP 分子标记技术对来自日本的 11 个柿品种和中国的 10 个柿品种进行亲缘关系分析,结果表明 SRAP 分子标记能很好鉴定它们的

遗传关系,10 个中国柿分两大类群,而日本柿分为 1 个类群及 1 个亚类群,且推测中国和日本甜柿及非甜柿有着不同的遗传背景。张春雨等(2009)应用 SRAP 分子标记较为成功地分析了中国新疆野苹果 4 个种群的遗传多样性,结果表明巩留居群的遗传多样性最为丰富,建议优先保护该居群。於朝广等(2009)将 SRAP 分子标记技术应用于落羽杉属植物的杂种鉴定研究中,且较好地对落羽杉与墨杉杂交所产生的 4 个后代进行了杂种真实性鉴定。刘志远等(2009)在构树种质资源的遗传多样性研究中,应用 SRAP 分子标记技术,用 17 对引物在 21 份材料中扩增出 439 条带,其中多态性条带占 72.6%,结果表明构树各种质的遗传距离与地理距离存在明显相关性,同时发现一些以转化为 SCAR 标记的特异性条带。

另外,SRAP 分子标记技术在山茶属植物的分类鉴定及遗传多样性研究中也开始得以应用。沈程文等(2009)对 25 份广东茶树种质和 5 份对照的亲缘关系进行 SRAP 分析,21 对 SRAP 引物共扩增多态性带 114 条,占总数的 88.67%,较好地对 30 份茶树材进行系统评价及分类。林萍等(2010)采用 SRAP 分子标记技术,对普通油茶(长林系列)的 12 个优良无性系进行分析,并在多态性高的 24 个位点上建立了全部供试材料的 DNA 指纹图谱,实现了对这 12 个无性系的有效鉴别。

这些研究结果表明,在小果油茶的遗传多样性研究中采用 SRAP 分子标记技术是完全可行的。

1.9 国内外植物(木本)杂交渐渗研究概况

杂交渐渗在国外起步较早且研究较多。杂交渐渗(introgressive hybridization)是生物界物种间的自然杂交和反复回交使一个物种的遗传物质穿越种间生殖隔离转入到另一个物种内,形成基因渐渗(Anderson, 1953; Bobby et al., 1990)。杂交渐渗对物种的形成及进化具有明显地推动作用,而这种作用在同域分布的物种中表现更加明显,可能是分布区的重叠使得不同物种更容易发生种间杂交渐渗,且杂交后代的遗传变异,又使得同域分布区成为一个天然的杂交带,很大程度地促进了新的物种形成及进化(Rieseberg et al., 2003; Mallet, 2007)。Mallet(2005)在生态进化趋势研究中指出超过 25%植物的存在种间杂交渐渗现象,其中超过 40%的被子植物存在这种情况(Mallet, 2007)。

Randy 等(1990)通过观测叶绿体 DNA 和核糖体 DNA 限制性变异位点,发现杨柳科杨属的 10 个物种及柳属的一个物种存在明显的种间杂交现象。Konstantin 和 Fritz(1995)对分别采自挪威、西伯利亚及两物种同域分布区的 10 份云杉种子样品进行等位酶分析,结果发现西伯利亚云杉和挪威云杉存在较为明显的杂交