

海南岛油茶种质资源遗传多样性的 SRAP 分析

陈宣¹, 云勇¹, 吴宇佳², 戚华沙¹, 杨立荣¹, 陈加利¹, 郑道君^{1*}

(1. 海南省农业科学院热带园艺研究所, 海南省热带特种经济植物种质资源创新利用重点实验室, 海口 571100; 2. 海南省农业科学院农业环境与土壤研究所, 海口 571100)

摘要: 为了解海南岛油茶(*Camellia oleifera*)种质资源的遗传多样性, 采用 SRAP 分子标记, 对海南岛油茶主要分布区的 31 个居群进行了遗传多样性和亲缘关系分析。结果表明, 海南岛油茶资源的遗传多样性低, 物种水平的多态性百分率(PPB)为 98.30%, Nei's 基因多样性(H)为 0.222 8, Shannon 信息指数(I)为 0.353 8; 居群水平的 PPB=40.96%, 观测等位基因数(N_a)为 1.409 6, 有效等位基因数(N_e)为 1.237 1, $H=0.138 5$, $I=0.208 3$, 这与海南岛油茶丰富的表型多样性水平不一致。海南岛油茶资源遗传分化较大, 居群间基因交流有限, 不同居群间的遗传分化指数(G_{st})为 0.380, 基因流(N_m)为 0.813 9<1。遗传变异主要发生在居群内, 有 38.05%的变异存在居群间, 61.95%存在于居群内。遗传距离为 0.022 6~0.276 4, 平均为 0.107 7, 居群间的亲缘关系较近。UPGMA 聚类分析表明, 在遗传距离为 0.11 处, 可将 31 个油茶居群聚为 6 类, 表现出明显的行政区域性, 而与地理距离关系不大。因此, 海南岛油茶资源遗传多样性低, 亲缘关系近可能导致自交或近交不亲和, 可能是海南油茶林分花量大而结实低的主要内在原因。

关键词: 油茶; SRAP 标记; 遗传多样性; 居群; 海南岛

doi: 10.11926/jtsb.4027

Genetic Diversity Analysis of *Camellia oleifera* Resources Based on SRAP Markers in Hainan Island

CHEN Xuan¹, YUN Yong¹, WU Yu-jia², QI Hua-sha¹, YANG Li-rong¹, CHEN Jia-li¹, ZHENG Dao-jun^{1*}

(1. Institute of Tropical Horticulture, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Hainan Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Tropical Special Economic Plants, Haikou 571100, China; 2. Institute of Agricultural Environment and Soil, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

Abstract: In order to evaluate genetic diversity of *Camellia oleifera* resources in Hainan Island, the genetic diversity and relationship among 31 populations were analyzed by using SRAP molecular marker. The results showed that the genetic diversity of *C. oleifera* resources in Hainan Island was low, the percentage of polymorphic bands (PPB), Nei's genetic diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 98.30%, 0.222 8 and 0.353 8 at the species level, and 40.96%, 0.138 5 and 0.208 3 at the population level, respectively, which was inconsistent with their rich phenotypic diversity in Hainan. The coefficient of genetic differentiation among populations (G_{st}) was 0.380 5, and the gene flow (N_m) was 0.813 9 between different populations, indicating that genetic differentiation was high with limited gene flow among populations. The genetic variation mainly existed within populations (61.95%) and few among them (38.05%). The genetic distance ranged from 0.022 6 to 0.276 4,

收稿日期: 2018-12-04 接受日期: 2019-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860082); 海南省省属科研院所技术开发专项(KYYS-2018-14); 海南省农业科学院 2018 年度农业科技创新专项资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31860082), the Project for Technology Development of Hainan Provincial Scientific Research Institutions (Grant No. KYYS-2018-14), and the Project for Agricultural Science and Technology Innovation of Hainan Academy of Agricultural Sciences in 2018.

作者简介: 陈宣(1983~), 男, 硕士, 副研究员。研究方向为热带经济作物遗传育种。E-mail: chenxuan06@sina.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: daojunzh@163.com

with the mean of 0.107 7 between 31 populations, which revealed the relatively close genetic relationship among the populations. UPGMA cluster analysis showed that 31 populations could be divided into 6 groups at the genetic distance of 0.11, showing obvious administrative area, but had little to do with geographical distance. So, it was suggested that the relatively close genetic relationship of *C. oleifera* resources in Hainan Island might cause self-incompatibility, which could be the main internal cause for blooming but low yield of *C. oleifera* forests in Hainan Island.

Key words: *Camellia oleifera*; SRAP marker; Genetic diversity; Population; Hainan Island

油茶主要是指山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)植物中油脂含量较高且具有栽培经济价值的一类植物的总称,是我国重要的木本食用油料树种。油茶在海南俗称“山柚”。海南岛为中国油茶资源分布的最南缘,各地均有野生种和栽培种,具有种植和利用油茶的悠久历史^[1]。海南岛气候独特,海峡隔离,油茶又是异花授粉植物,在环境和遗传控制的双重作用下,海南岛油茶资源表型变异极为丰富且独特^[2-4]。据海南省林业局统计,2015年底,全省油茶种植面积达到4 100 hm²,主要分布在琼海、屯昌、澄迈、五指山、琼中、定安、海口等市县,2015年茶籽产量486.3 t,山柚油产量超过80 t,约占全国产量的0.1%。至2018年底,海南省已认定油茶优良品种20个,但尚未建立规范的良好采穗圃。海南岛具有丰富而独特的油茶资源、良好的水热条件和产业发展势头,近年来海南岛油茶资源的研究与开发利用受到普遍关注,急需对海南岛油茶资源开展科学系统评价。

植物种质资源鉴定与评价是资源有效保护与创新利用的前提。分子标记技术不受季节和环境的限制,稳定性高,并且分子标记数量极多,遍及整个基因组,多态性高,是植物资源鉴定与评价的重要手段。其中,RAPD、ISSR和AFLP标记技术已成功应用于油茶资源的遗传多样性评价^[5-7]、品种鉴定与分类^[8-10]、以及抗病性、果油率和产油量与分子标记的相关性^[11],为油茶育种亲本的选配和品种鉴定提供科学理论依据。相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)技术是利用特定引物对ORFs区域(open reading frames)进行扩增,具有易于操作、花费少、多态性强及标记分布均匀等特点^[12],已广泛应用于植物遗传多样性研究^[13-14]。前人^[15-17]应用SRAP标记技术分别对四川省名邛台地油茶资源、全国19个居群的小果油茶资源和广东省广宁红花油茶种质资源进行了遗传多样性评价。

本课题组前期研究表明,海南油茶资源具有丰富的表型多样性,这是否是其丰富遗传多样性的体现?群体间的遗传结构和亲缘关系是怎样的模式?在悠久的引种与栽培过程中基因流是否通畅?本研究利用SRAP分子标记技术,对海南岛主要油茶分布区的代表性种质资源进行遗传多样性分析,探讨其遗传分化和亲缘关系,为海南油茶分子标记辅助育种,充分挖掘海南油茶优良种质资源和研究其引种栽培历史提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料来自海南省海口、定安、文昌、琼海、澄迈、屯昌、琼中、五指山和临高等9个市县27个乡镇(国营农场)的31个油茶居群,基本涵盖了海南省的主要油茶分布区。居群信息见表1。

1.2 方法

总DNA的提取 采用彭邵锋^[8]的改良CTAB法。

SRAP-PCR扩增 反应在Icycler™ Thermal Cycler型PCR仪上进行。SRAP-PCR反应条件和反应程序按郑道君等^[13]的方法,引物由上海英骏生物技术有限公司合成,每个引物对供试材料重复扩增2次。取10 μL扩增产物,采用2.0%琼脂糖凝胶电泳检测SRAP-PCR的产物,GoodView核酸染色,在Gel Doc XR型凝胶成像分析系统下照相并记录。以3S 100 bp DNA ladder作为对照分子量标准。

1.3 数据的统计分析

根据marker确定PCR条带分子量,选择清晰的扩增谱带用0-1二元矩阵表示,然后统计分析多态性条带百分率(PPB)=多态位点数/位点总数。将0-1矩阵在NTSYSpc(2.1版)软件中处理,应用

表 1 海南油茶居群

Table 1 31 populations in Hainan

序号 No.	采样地 Origin	编号 Code	造林年份 Year of afforestation	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	生境 Habitat
1	琼海石壁 Shibi, Qionghai	sbwl	1970	110.287 42°	19.159 32°	村旁次生林下散生 Scattered in secondary forest near village
2	琼海中原 Zhongyuan, Qionghai	zyxc	不详 unknown	110.438 48°	19.087 47°	路边次生林下散生 Scattered in secondary forest on the roadside
3	琼海阳江 Yangjiang, Qionghai	yjmp	1950	110.377 03°	19.132 32°	路边散生 Scattered in roadside
4	琼海会山 Huishan, Qionghai	hszj	不详 unknown	110.305 67°	19.088 35°	路边散生 Scattered in roadside
5	琼海龙江 Longjiang, Qionghai	lj	不详 unknown	110.295 60°	19.138 57°	路边散生 Scattered in roadside
6	定安岭口 Lingkou, Ding'an	lkfk	不详 unknown	110.292 18°	19.314 67°	村旁次生林下散生 Scattered in secondary forest near village
7	定安岭口 Lingkou, Ding'an	lkly	不详 unknown	110.281 50°	19.347 18°	村旁次生林下散生 Scattered in secondary forest near village
8	文昌锦山 Jinshan, Wenchang	jslj	1950	110.668 80°	19.952 13°	村旁次生林下散生 Scattered in secondary forest near village
9	文昌潭牛 Tanniu, Wenchang	tnlf	1970	110.720 73°	19.737 20°	村旁次生林下散生 Scattered in secondary forest near village
10	海口三江 Sanjiang, Haikou	sjqm	1950	110.610 95°	19.836 27°	路旁次生林下散生 Scattered in secondary forest on the roadside
11	海口三江 Sanjiang, Haikou	sjgx	1970	110.611 05°	19.836 37°	坡地纯林 Pure forest in slop
12	海口红旗 Hongqi, Haikou	hq	不详 unknown	110.611 14°	19.836 39°	路边散生 Scattered in roadside
13	海口甲子 Jiazi, Haikou	jzcc	1970	110.457 50°	19.628 03°	路边纯林 Pure forest on the roadside
14	海口甲子 Jiazi, Haikou	jzbs	1950	110.501 67°	19.630 08°	路边次生林中散生 Scattered in secondary forest on the roadside
15	海口石山 Shishan, Haikou	ssxj	1970	110.231 96°	19.903 94°	路边次生林中散生 Scattered in secondary forest on the roadside
16	海口永兴 Yongxing, Haikou	yxrz	1970	110.267 50°	20.091 94°	路边次生林中散生 Scattered in secondary forest on the roadside
17	临高皇桐 Huangtong, Lingao	htww	不详 unknown	110.002 22°	19.886 94°	坡地纯林 Pure forest in sloping fields
18	临高和舍 Heshe, Lingao	hsct	1960	109.930 28°	19.840 28°	橡胶林缘散生 Scattered in rubber forest edge
19	临高南宝 Nanbao, Lingao	nbgj	1970	109.773 33°	19.778 61°	坡地次生林中散生 Scattered in secondary forest in slop
20	澄迈文儒 Wenru, Chengmai	sfbl	不详 unknown	110.103 61°	19.570 89°	坡地纯林 Pure forest in sloping fields
21	澄迈文儒 Wenru, Chengmai	wral	不详 unknown	110.062 83°	19.555 25°	坡地纯林 Pure forest in sloping fields
22	澄迈加乐 Jiale, Chengmai	jllm	不详 unknown	110.008 00°	19.580 69°	槟榔园边散生 Scattered in betel nut edge
23	澄迈中兴 Zhongxing, Chengmai	zxlw	不详 unknown	109.913 81°	19.638 39°	路边散生 Scattered in roadside

续表(Continued)

序号 No.	采样地 Origin	编号 Code	造林年份 Year of afforestation	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	生境 Habitat
24	屯昌黄岭 Huangling, Tunchang	hlsy	不详 unknown	110.010 06°	19.315 83°	坡地纯林 Pure forest in slop
25	琼中湾岭 Wanling, Qiongzong	wlby	不详 unknown	109.954 39°	19.175 14°	坡地纯林 Pure forest in slop
26	琼中长征 Changzheng, Qiongzong	czxz	1980	109.862 72°	18.975 78°	坡地纯林 Pure forest in slop
27	琼中黎母山 Limushan, Qiongzong	nknl	1970	109.863 89°	19.253 17°	路边纯林 Pure forest in roadside
28	五指山通什 Tongza, Wuzhishan	csfs	1970	109.552 08°	18.843 22°	山脚纯林 Pure forest at hill foot
29	五指山南圣 Nansheng, Wuzhishan	nsny	1970	109.609 53°	18.743 14°	山腰纯林 Pure forest in hillside
30	五指山畅好 Changhao, Wuzhishan	chtw	1980	109.466 08°	18.679 89°	山腰纯林 Pure forest in hillside
31	五指山水满 Shuiman, Wuzhishan	smxc	1970	109.662 28°	18.881 67°	山顶纯林 Pure forest on the top of hill

SIMQUAL 法计算 Jaccard 遗传相似性系数(genetic similarity, GS), $GS_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 式中, N_{ij} 指两个个体共有的带数, $N_i + N_j$ 指两个个体所有带数之和。采用 SAHN 程序和 UPGMA (unweighted pair group mean average) 方法进行聚类分析, 通过 Tree plot 模块构建聚类图。应用 POPGENE 1.31 软件在假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下进行遗传参数分析, 分别计算观测等位基因数(observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数(effective number of alleles, N_e)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity, H)、Shannon's 信息指数(Shannon's information index, I), 并对不同居群间的遗传分化系数(G_{st})和基因流进行分析。为了明确这些多样性指数

在各居群间的变异程度, 对所有居群的各项参数进行变异系数(CV, %)分析。

2 结果和分析

2.1 SRAP-PCR 扩增多态性

选取油茶来源地域及形态不同的 5 份种质材料, 对经退火温度初选的 100 对 SRAP 引物进行筛选, 共选出 9 对有效引物, 然后分别对 31 个居群材料进行 SRAP-PCR 扩增, 共扩增出 122 条清晰的谱带, 每对引物平均扩增 13.56 条, 其中多态性条带 120 条, 扩增的多态性条带百分率(PPB)高达 98.30% (表 2), 多数条带为 200~2 500 bp。每对引

表 2 9 对 SRAP 引物对 31 个海南油茶居群种质的扩增

Table 2 Amplification of 31 populations of *Camellia oleifera* in Hainan Island by 9 pairs of SRAP primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')		扩增总条带 Total band amplified	多态性条带 Polymorphism band	多态性比率 % of polymorphic bands (PPB)
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer			
Me1-Em4	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTTGA	16	15	93.75
Me2-Em5	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAAC	18	18	100
Me2-Em3	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTTGAC	11	10	90.91
Me2-Em17	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTTCTC	10	10	100
Me3-Em10	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTTAG	14	14	100
Me3-Em2	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTTGTC	11	11	100
Me5-Em7	TGAGTCCAAACCGGTGT	GACTGCGTACGAATTTGA	18	18	100
Me5-Em10	TGAGTCCAAACCGGTGT	GACTGCGTACGAATTTAG	11	11	100
Me6-Em35	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTTCTCA	13	13	100
总计 Total			122	120	98.30

物对不同材料扩增的 SRAP-PCR 产物有一定差异, 反映出不同地域与不同居群的种质材料之间存在遗传多样性以及不同程度的亲缘关系。

2.2 遗传多样性分析

根据 SRAP-PCR 谱带统计结果, 利用 PopGene 软件分析 31 个居群的遗传多样性(表 3)。在物种水平上, PPB 为 98.30%, N_a 为 1.975 4, N_e 为 1.352 8, H 为 0.222 8, I 为 0.353 8, 可见海南岛油茶资源具

有较高的遗传多样性水平。但是, 在居群水平上的遗传变异却比较低, PPB 为 13.93%~59.84%, 平均 40.96%; N_a 为 1.139 3~1.598 4, 平均 1.409; N_e 为 1.083 4~1.357 9, 平均 1.237; I 为 0.14 8~0.307 7, 平均 0.208 3; H 为 0.107 7~0.193 5, 平均 0.138 5。31 个居群间的遗传多样性差异较明显, H 、 I 和 PPB 的变异系数(CV)分别为 23.82%、23.67%和 24.26%, 其中 sjgx 居群的遗传多样性水平最低, zxlw 居群的遗传多样性水平最高。

表 3 海南岛油茶居群的遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity indexes of 31 populations of *Camellia oleifera* in Hainan Island

序号 No.	居群编号 Code	观测等位基因数 Observed number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	Nei' 基因多样性指 数 Nei's gene diversity index (H)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I)	多态性百分率 % of polymorphic band (PPB)
1	sbwl	1.491 8	1.302 1	0.175 8	0.262 3	49.18
2	zyxc	1.368 9	1.197 7	0.117 9	0.180 0	36.89
3	yjmp	1.565 6	1.283 6	0.172 9	0.265 6	56.56
4	hszj	1.368 9	1.230 8	0.133 8	0.199 5	36.89
5	lj	1.401 6	1.261 8	0.148 1	0.218 9	40.16
6	lkfh	1.360 7	1.202 3	0.117 7	0.177 2	36.07
7	lkly	1.434 4	1.197 3	0.120 2	0.187 1	43.44
8	jslj	1.344 3	1.223 7	0.127 5	0.188 9	34.43
9	tnlf	1.319 7	1.190 7	0.109 9	0.164 6	31.97
10	sjqm	1.336 1	1.206 8	0.120 0	0.179 4	33.61
11	sjgx	1.139 3	1.083 4	0.048 6	0.073 0	13.93
12	hq	1.352 5	1.192 3	0.114 0	0.173 3	35.25
13	jzcc	1.467 2	1.255 6	0.152 6	0.231 5	46.72
14	jzbs	1.377 0	1.177 3	0.107 7	0.167 0	37.70
15	ssjx	1.409 8	1.240 4	0.139 2	0.208 9	40.98
16	yxrz	1.368 9	1.204 5	0.120 0	0.181 8	36.89
17	htww	1.532 8	1.305 9	0.178 8	0.269 3	53.28
18	hsct	1.385 2	1.217 5	0.128 7	0.194 3	38.52
19	nbgj	1.336 1	1.197 6	0.115 8	0.174 2	33.61
20	sfl	1.393 4	1.221 0	0.129 5	0.195 1	39.34
21	wral	1.516 4	1.273 2	0.161 8	0.245 8	51.64
22	jllm	1.434 4	1.265 8	0.153 9	0.229 2	43.44
23	zxlw	1.598 4	1.328 7	0.190 8	0.287 9	59.84
24	hlsy	1.565 6	1.357 9	0.207 0	0.307 7	56.56
25	wlby	1.336 1	1.224 6	0.127 1	0.187 1	33.61
26	czxz	1.368 9	1.230 8	0.133 6	0.199 2	36.89
27	nknl	1.549 2	1.336 3	0.193 5	0.288 3	54.92
28	csfs	1.475 4	1.268 5	0.158 5	0.239 5	47.54
29	nsny	1.327 9	1.198 6	0.115 6	0.172 9	32.79
30	chtw	1.500 0	1.296 4	0.173 2	0.259 4	50.00
31	smxc	1.270 5	1.175 5	0.099 9	0.148 0	27.05
	居群水平 Population level	1.409 6	1.237 1	0.138 5	0.208 3	40.96
	物种水平 Species level	1.975 4	1.352 8	0.222 8	0.353 8	97.54

2.3 居群的遗传结构和遗传变异分析

对 31 个居群进行基因分化分析, 计算不同居群间的遗传分化系数(G_{st}), 结果表明, 居群总的遗传多样性(H_t)为 $0.223\ 6 \pm 0.028\ 2$, 居群内的基因多样性(H_s)为 $0.138\ 5 \pm 0.010\ 3$, 基因流(N_m)仅为 $0.813\ 9 < 1$, 表明海南岛油茶遗传多样性水平较低, G_{st} 为 $0.380\ 5$, 可见居群间具有较大的遗传分化, 同时也表明有 38.05% 的遗传变异存在居群间, 而 61.95% 的遗传变异存在于居群内, 其遗传变异以居群内变异为主。

2.4 聚类分析

根据 SRAP 扩增条带分析结果, 采用 UPGMA 法对 31 个不同居群进行聚类分析(图 1)。不同居群间的遗传距离为 $0.022\ 6 \sim 0.276\ 4$, 平均遗传距离为 $0.107\ 7$ 。其中 lkfh 与 lkly 遗传关系最近, 遗传距离仅 $0.022\ 6$, 均来自定安岭口镇; sjgx 与 tnlf 虽然地理距离不远, 但遗传距离却最远, 为 $0.276\ 4$ 。在遗传距离为 0.11 处, 可将 31 个居群明显聚为 6 类, 其中类群 A 由来自琼海的所有居群 sbwl、yjmp、

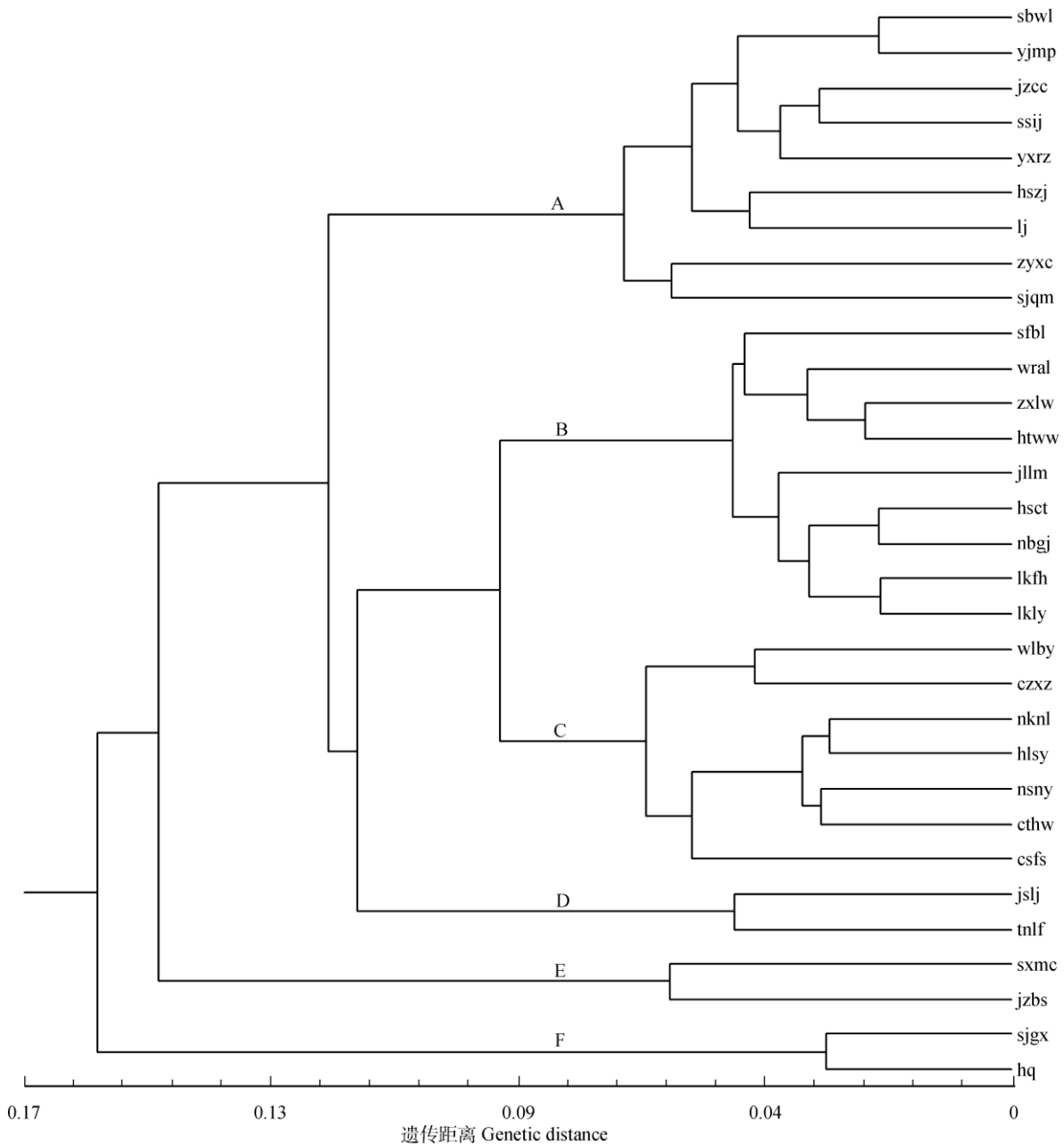


图 1 31 个海南油茶居群间的聚类分析图

Fig. 1 Cluster dendrogram based on SRAP analysis for 31 populations of tea-oil *Camellia* in Hainan Island

hszj、lj、zyxc 和海口的部分居群 jzcc、ssjx、yxrz、sjqm 组成; B 类群包括澄迈的所有居群 sfbl、wral、zxlw、jllm, 临高的所有居群 htww、hsct、nbgj 和定安的所有居群 lkfh 和 lkly; C 类群由琼中的所有居群 wlby、czxz、nkn1, 屯昌的 hlsy, 以及五指山的 cthw 和 csfs 组成; D 类群仅由文昌的 2 个居群 js1j 和 tnlf 组成; E 类包括五指山的 smxc 和海口的 jzbs; F 类是海口的 sjgx 和 hq。除了来自海口的居群和五指山居群不能各自聚为一类外, 其他市县来源的居群均按行政区域聚为一类, 表现出明显的区域性。

3 讨论

3.1 海南岛油茶资源的遗传多样性

遗传多样性是物种长期生存和保持进化的基础, 同时也植物良种培育的遗传物质基础。PPB、 H 、 I 作为评价种群内和种群间遗传多样性的指标, 其数值越大, 表明种群的遗传多样性越高^[18]。SRAP、RAPD 和 ISSR 一样, 均为显性标记, 研究结果具有可比性。Nybom^[19]统计认为植物的平均 H 为 0.22 (基于 RAPD 和 ISSR 的平均值), 其中 37 种多年生植物的 H 为 0.25。比较而言, 海南油茶资源物种水平上的 H 值(0.222 8)仅与上述物种的平均值相近, 而居群水平的平均 H_e 仅为 0.138 5 (0.048 6~0.207)。此外, 黄勇等^[16]利用 SRAP 分子标记对贵州、湖南、江西等 8 个小果油茶分布区 19 个居群进行遗传多样性分析, 认为小果油茶具有丰富的遗传多样性, 19 个居群的 H 、 I 、PPB 分别为 0.321 3~0.388 7、0.473 2~0.567 6 和 84.96%~95.58%; 物种水平的 H 、 I 、PPB 分别为 0.422 3、0.612 6 和 100%。谢荟等^[17]利用 SRAP 分子标记建立了广东省广宁红花油茶(*C. semi-serrata*)种质资源 4 个种群的遗传多样性评价体系, 结果表明, 种群的 H 、 I 、PPB 分别为 0.217 9~0.356 3、0.321 7~0.524 8 和 58.25%~92.72%, 平均值分别为 0.307 8、0.456 3 和 83.62%。张婷等^[20]采用 SRAP 标记对湖北省油茶 5 个居群的遗传多样性进行了研究, 结果表明, 居群的平均 N_e 、 H 、 I 分别为 1.516 1、0.274 8 和 0.389 9。因此, 本研究中海南岛油茶资源表现出较低的遗传多样性水平, 物种水平的 H 和 I 仅分别为 0.222 8 和 0.353 8; 居群的遗传变异较物种水平更低, H 和 I 仅为 0.048 6~0.207 和 0.073~0.288 3, 这与海南油茶在表型方面丰富的多样性水平不一致。杨立荣等^[21]对海南岛 21 个老油茶林果

实和种子的 10 个数量性状指标进行了分析, 结果表明海南油茶种实表型多样性十分丰富, 10 个种实数量性状的变异系数(CV)为 7.87%~52.93%, 平均变异系数为 29.36%, 变异程度均高于小果油茶(*C. meiocarpa*)、浙江红花油茶(*C. chekiangoleosa*)、滇西腾冲红花油茶(*C. reticulata*)、广东省的广宁红花油茶和越南油茶(*C. vietnamensis*); 平均 Shannon-Wiener 多样性指数为 2.749 9, 接近或大于小果油茶(主要分布于 7 个省份)。可见, 海南油茶低水平的遗传变异不能解析丰富的表型变异。

油茶组是山茶属中多倍体出现频率较高的类群, 有 $2x$ 、 $3x$ 、 $4x$ 、 $5x$ 、 $6x$ 、 $7x$ 和 $8x$, 且核型分析存在多样性, 其中奇数多倍体为栽培品种, 包括油茶(*C. oleifera*)、小果油茶、越南油茶和攸县油茶(*C. yubsienensis*)均是多倍体^[22-24], 这些物种除小果油茶外其余物种均存在种内多倍性现象, 如越南油茶核型 $2n=120=86m+26sm+8st+2sat$ ^[25], 或 $2n=105=61m+37sm+7st+2sat$, 或 $2n=120=86m+26sm+8st+2sat$ ^[26]; 普通油茶核型为 $2n=30=24m+4sm+2st+2sat$, 或 $2n=90=60m+29sm+1st+3sat$, 或 $2n=90=60m+22sm+8s$ ^[27]。倍性变异会影响个体、花朵和果实大小等农艺性状^[28]。海南油茶的核型多样性是否丰富? 是否在海南岛油茶资源丰富的表型多样性过程中扮演重要角色? 从本文中海南岛油茶资源较低水平的遗传多样性结果推测, 核型的变异或许不能使海南岛油茶资源间的遗传背景或遗传多样性变得丰富。目前, 本课题组正在进行海南岛油茶资源的核型多样性分析, 并研究其与形态多样性和遗传多样性的相关性, 对上述推测进行验证。

油茶在海南岛有悠久的栽培历史, 现存的油茶居群均是人工栽种的半野生居群, 海南岛油茶资源表现出物种水平高于居群水平的遗传多样性, 表明半野生海南油茶居群种源来源比较复杂, 而同一居群种源来源相对稳定。同时居群水平存在一定的遗传变异, 究其原因是这些居群均是以实生苗建成, 油茶是较为严格的虫媒异花授粉植物, F_1 代实生苗分离的结果。

3.2 海南岛油茶群体遗传结构与亲缘关系

油茶是较为严格的虫媒异花授粉植物。Nybom^[19]对 31 种杂交植物进行统计, 平均 G_{st} 为 0.22; 张德全等^[29]的统计表明, 虫媒植物的平均 G_{st} 为 0.264。本研究中 G_{st} 为 0.380 5, 高于上述平均值, 也比我

国小果油茶遗传分化值要高($G_{ST}=0.1343$)^[16], 可见海南岛油茶居群间具有较大的遗传分化。此外, 在整体水平上居群间的基因流为 0.8139, 说明海南岛油茶资源不同居群间存在较小的基因交流。遗传分化系数显示, 海南油茶总的遗传变异中有 38.05% 的变异存在于居群间, 有 61.95% 的遗传变异存在于居群内; 在小果油茶总的遗传变异中, 居群内占 86.58%, 而居群间仅占 13.42%^[16]; Kaundun^[30]利用 RAPD-PCR 标记对韩国、日本和台湾 27 个优良茶树品种的多样性进行了研究, 显示 71% 的变异位于组内, 29% 位于组间。本研究结论与其一致, 其遗传变异均以居群内变异为主。海南油茶资源 31 个居群间的遗传距离为 0.0226~0.2764, 平均为 0.1077, 显示较近的亲缘关系, 仅略高于广布于我国南方的小果油茶(19 个居群的遗传距离为 0.0216~0.1645, 平均为 0.0988)^[16]。聚类分析表明, 在遗传距离为 0.11 处, 可将 31 个海南油茶居群聚为 6 类, 聚类结果与行政区域有一定的相关性, 但与各居群的地理距离不相关, 除了来自海口的居群和五指山居群不能各自聚为一类外, 其他市县来源的居群均按行政区域聚为一类, 表现出明显的行政区域性。这与刘扬^[31]应用 ISSR 标记对来自海南、广西、江西的 55 份油茶资源进行多态性和聚类分析的结果基本一致, 也同小果油茶的聚类结果相一致^[16]。可见, 海南岛油茶亲缘关系较近, 且表现出较强的行政区域性。我们推测, 海南油茶资源居群的聚类关系可能与海南油茶悠久的引种栽培历史, 以及计划经济体制下各行政区域的油茶推广方式密切相关。

油茶为异花授粉植物, 自交或近交不亲和, 结实率极低^[32]。我们的调查表明, 现有海南岛油茶林分个体的开花率高, 可达 100%, 花量也极大, 但结果个体仅为 20% 左右, 甚至更低, 以致产量极低, 这种现象在近 5~10 年栽植的油茶林分中也表现得更为突出^[33], 极大地影响了农民种植油茶的信心和积极性。本研究表明海南岛油茶资源亲缘关系近, 依据油茶自交不结实或结实率低的特性, 因此, 我们认为海南岛油茶资源亲缘关系近可能造成自交或近交不亲和, 是致使海南油茶林分花量大而结实低的主要内在原因之一。本课题组下一步将从小气候对花粉活性和传粉者行为的影响、土壤养分供给对结实的影响, 以及林分个体间的遗传亲缘关系等方面进行分析和论证。

参考文献

- ZHOU Y D. On history and culture of *Camellia oleifera* [J]. Trop For, 2017, 45(2): 42–48. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2017.02.013.
周亚东. 浅谈油茶文化 [J]. 热带林业, 2017, 45(2): 42–48. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2017.02.013.
- YUAN J, HAN Z Q, HE S Y, et al. Investigation and cluster analysis of main morphological and economical characters for oiltea resource in Hainan Province [J]. J Plant Genet Resour, 2014, 15(6): 1380–1384. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2014.06.031.
袁军, 韩志强, 贺舍予, 等. 海南省油茶资源主要形态和经济性状及聚类分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(6): 1380–1384. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2014.06.031.
- ZHENG D J, PAN X Z, ZHANG D M, et al. Survey and analysis on tea-oil camellia resource in Hainan [J]. J NW For Univ, 2016, 31(1): 130–135. doi: 10.3969/j.issn.1001-7461.2016.01.24.
郑道君, 潘孝忠, 张冬明, 等. 海南油茶资源调查与分析 [J]. 西北林学院学报, 2016, 31(1): 130–135. doi: 10.3969/j.issn.1001-7461.2016.01.24.
- CHEN Y Z, CHEN L S, LI R F, et al. Survey and the industry development proposals of *Camellia* sp. resources in Hainan [J]. Trop For, 2017, 45(1): 49–52. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2017.01.015.
陈永忠, 陈隆升, 李儒法, 等. 海南油茶资源调研及产业发展建议 [J]. 热带林业, 2017, 45(1): 49–52. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2017.01.015.
- HUANG Y F, CHEN X M, ZHUANG X Y, et al. Analysis of genetic diversity in *Camellia oleifera* germplasms [J]. Sci Silv Sin, 2006, 42(4): 38–43. doi: 10.3321/j.issn:1001-7488.2006.04.007.
黄永芳, 陈锡沐, 庄雪影, 等. 油茶种质资源遗传多样性分析 [J]. 林业科学, 2006, 42(4): 38–43. doi: 10.3321/j.issn:1001-7488.2006.04.007.
- YU X Y, YU F Y, LIU J B, et al. Identification and genetic diversity analysis of *Camellia oleifera* varieties using ISSR marker [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2013, 37(1): 61–66.
于小玉, 喻方圆, 刘建兵, 等. ISSR 在油茶品种鉴别和遗传多样性分析中的应用 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2013, 37(1): 61–66.
- ZHANG T, LIU S Q, MEI H, et al. AFLP analysis on the genetic diversity of *Camellia oleifera* from different regions of Hubei Province [J]. J Anhui Agric Sci, 2011, 39(23): 14070–14071, 14075. doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2011.23.067.
张婷, 刘双青, 梅辉, 等. 湖北省不同地区油茶遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14070–14071, 14075. doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2011.23.067.
- PENG S F, ZHANG D Q, CHEN Y Z, et al. Genetic diversity analysis

- of elite cultivars of *Camellia oleifera* by SRAP [J]. J CS Univ For Technol, 2011, 31(1): 80–85. doi: 10.3969/j.issn.1673-923X.2011.01.013.
- 彭邵锋, 张党权, 陈永忠, 等. 14 个油茶良种遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(1): 80–85. doi: 10.3969/j.issn.1673-923X.2011.01.013.
- [9] ZHANG G W, ZHONG W B, WUYUNTANA, et al. Identification of oil tea (*Camellia oleifera*) superior clones by ISSR molecular marker [J]. For Res, 2007, 20(2): 278–282. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2007.02.024.
- 张国武, 钟文斌, 乌云塔娜, 等. 油茶优良无性系 ISSR 分子鉴别 [J]. 林业科学研究, 2007, 20(2): 278–282. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2007.02.024.
- [10] WU Y Y. Analysis of genetic diversity and identification of *Camellia oleifera* germplasm [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2011: 36–40.
- 吴莺莺. 油茶种质资源遗传多样性分析及品种鉴定 [D]. 南京: 南京林业大学, 2011: 36–40.
- [11] LI L. Analysis on genetic diversity and quality of *Camellia oleifera* resources in Hubei Province [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010: 18–34.
- 李良. 湖北省油茶优良单株遗传多样性及品质初步分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 18–34.
- [12] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455–461. doi: 10.1007/s001220100570.
- [13] ZHENG D J, YUN T H, ZHANG Z L, et al. Study on genetic diversity and relationship for the Hainan island landraces of *Cucurbita moschata* [J]. J Nucl Agric Sci, 2016, 30(5): 869–877. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.05.0869.
- 郑道君, 云天海, 张治礼, 等. 中国南瓜海南农家品种资源遗传多样性和亲缘关系研究 [J]. 核农学报, 2016, 30(5): 869–877. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.05.0869.
- [14] QI L, WANG X N, ZHANG J Z, et al. Study on genetic diversity and differentiation of three wild rice species in Hainan using SRAP markers [J]. J Plant Genet Resour, 2013, 14(3): 402–406.
- 齐兰, 王效宁, 张吉贞, 等. 利用 SRAP 标记研究海南野生稻的遗传多样性与遗传分化 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 402–406.
- [15] ZHOU L J, KAO A D, LIU J, et al. Genetic diversity analysis of wild *Camellia*'s germplasm resources based on SRAP markers [J]. Mol Plant Breed, 2017, 15(10): 4242–4247.
- 周莉君, 考安都, 刘静, 等. 基于 SRAP 标记的野生油茶种质遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4242–4247.
- [16] HUANG Y. Analysis of *Camellia meiocarpa* genetic diversity based on SRAP markers [J]. Sci Silv Sin, 2013, 49(3): 43–50. doi: 10.11707/j.1001-7488.20130306.
- 黄勇. 基于 SRAP 分子标记的小果油茶遗传多样性分析 [J]. 林业科学, 2013, 49(3): 43–50. doi: 10.11707/j.1001-7488.20130306.
- [17] XIE H, ZHU W J, ZHANG Y Z, et al. Genetic diversity of *Camellia semiserrata* chi germplasm based on SRAP markers [J]. J CS Univ For Technol, 2017, 37(8): 93–97, 113.
- 谢荟, 祝文娟, 张应中, 等. 基于 SRAP 分子标记的广宁红花油茶种质资源遗传多样性研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2017, 37(8): 93–97, 113.
- [18] WU Z X, WANG H Z, SHI N N, et al. The genetic diversity of *Cymbidium* by ISSR [J]. Hereditas, 2008, 30(5): 627–632. doi: 10.3321/j.issn:0253-9772.2008.05.016.
- 吴振兴, 王慧中, 施农农, 等. 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 遗传, 2008, 30(5): 627–632. doi: 10.3321/j.issn:0253-9772.2008.05.016.
- [19] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Mol Ecol, 2004, 13(5): 1143–1155. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x.
- [20] ZHANG T, LIU S Q, MEI H, et al. Genetic diversity of *Camellia oleifera* from Hubei province revealed by SRAP analysis [J]. J Huazhong Norm Univ (Nat Sci), 2011, 45(3): 477–479, 484.
- 张婷, 刘双青, 梅辉, 等. 湖北省油茶资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2011, 45(3): 477–479, 484.
- [21] YANG L R, ZHANG Z L, CHEN J L, et al. The quantitative characters and diversity of oiltea fruit in Hainan Province [J]. Nonwood For Res, 2018, 36(3): 69–76. doi: 10.14067/j.cnki.1003-8981.2018.03.011.
- 杨立荣, 张治礼, 陈加利, 等. 海南油茶种实数量性状多样性评价 [J]. 经济林研究, 2018, 36(3): 69–76. doi: 10.14067/j.cnki.1003-8981.2018.03.011.
- [22] LI G T, LIANG T. Chromosome numbers and karyotypes in the genus *Camellia* [J]. Guihaia, 1990, 10(2): 127–138.
- 李光涛, 梁涛. 山茶属植物的染色体数目和核型 [J]. 广西植物, 1990, 10(2): 127–138.
- [23] GU Z J, SUN X F. A karyomorphological study of seventeen species of Chinese *Camellia* [J]. Acta Bot Yunnan, 1997, 19(2): 159–170.
- 顾志建, 孙先凤. 山茶属 17 个种的核形态学研究 [J]. 云南植物研究, 1997, 19(2): 159–170.
- [24] ZHANG W J, MIN T L. A cytogeographical study of *Camellia*, Sect. *Camellia* [J]. Acta Bot Yunnan, 1998, 20(3): 321–328.
- 张文驹, 闵天禄. 山茶属山茶组的细胞地理学研究 [J]. 云南植物研究, 1998, 20(3): 321–328.

- [25] MO Z Q. Karyotype analysis in *Camellia vietnamensis* [J]. Guihaia, 1990, 10(1): 31–32.
莫泽乾. 越南油茶的核型分析 [J]. 广西植物, 1990, 10(1): 31–32.
- [26] XIAO T, GU Z, XIA L. A karyomorphological study of ten species of Chinese *Camellia* [J]. La Kromosomo, 1991, 2(61): 2051–2085.
- [27] LI M Q. Karyotype and banding patterns of Giemsa C-bands in *Camellia oleifera* and *Castanea mollissima* [J]. For Sci Technol, 1981 (4): 9–12.
黎麦秋. 普通油茶、板栗染色体组型和 Giemsa C-带的带型研究 [J]. 林业科技通讯, 1981(4): 9–12.
- [28] QIN S Y, RONG J, ZHANG W J, et al. Cultivation history of *Camellia oleifera* and genetic resources in the Yangtze River Basin [J]. Biodiv Sci, 2018, 26(4): 384–395. doi: 10.17520/biods.2017254.
秦声远, 戎俊, 张文驹, 等. 油茶栽培历史与长江流域油茶遗传资源 [J]. 生物多样性, 2018, 26(4): 384–395. doi: 10.17520/biods.2017254.
- [29] ZHANG D Q, YANG Y P. A statistical and comparative analysis of genetic diversity detected by different molecular markers [J]. Acta Bot Yunnan, 2008, 30(2): 159–167.
张德全, 杨永平. 几种常用分子标记遗传多样性参数的统计分析 [J]. 云南植物研究, 2008, 30(2): 159–167.
- [30] KAUNDUN S S, ZHYVOLOUP A, PARK Y G. Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers [J]. Euphytica, 2000, 115(1): 7–16. doi: 10.1023/A:100393912.
- [31] LIU Y, PENG Y, HE R, et al. Genetic diversity of *Camellia oleifera* in Hainan by ISSR [J]. Mol Plant Breeding, 2016, 14(2): 517–523.
刘扬, 彭赞, 贺瑞, 等. 基于 ISSR 标记的海南油茶种质资源遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 517–523.
- [32] DENG Y Y, YU X L, LUO Y B. The role of native bees on the reproductive success of *Camellia oleifera* in Hunan Province, central south China [J]. Acta Ecol Sin, 2010, 30(16): 4427–4436.
邓园艺, 喻勋林, 罗毅波. 传粉昆虫对我国中南地区油茶结实和结籽的作用 [J]. 生态学报, 2010, 30(16): 4427–4436.
- [33] ZHENG D J, PAN X Z, XIE L S, et al. Investigation and analysis of *Camellia oleifera* industry development status in Hainan Province [J]. Nonwood For Res, 2015, 33(1): 131–135. doi: 10.14067/j.cnki.1003-8981.2015.01.025.
郑道君, 潘孝忠, 谢良商, 等. 海南省油茶产业发展现状调查与分析 [J]. 经济林研究, 2015, 33(1): 131–135. doi: 10.14067/j.cnki.1003-8981.2015.01.025.