

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.03.003

基于 SSR 标记的油橄榄主要栽培品种 子代父本分析

邵文豪^{1,2}, 王兆山¹, 张建国^{1*}

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

2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 杭州 311400)

摘要: [目的] 对我国甘肃武都油橄榄品种园主要栽培品种子代进行父本分析, 鉴定真实父本, 探讨品种亲和性, 为品种园授粉品种的选择提供科学依据。[方法] 以武都油橄榄品种园 114 份种质为候选父本, 基于 14 对 SSR 荧光标记, 利用 Cervus 3.0 软件检测亲本分析相关参数, 对‘城固 32’、‘豆果’、‘贺吉布兰克’和‘皮瓜尔’4 个主要栽培品种子代进行真实父本鉴定。[结果] 14 个 SSR 位点多态性高, 累积排除概率随位点数增加而增大。对于单亲已知类非父排除概率 (NE-2P), 14 个位点的累积排除概率高达 0.999。通过比较子代、母本和候选父本的基因型, 计算出每个候选父本的似然对数比, 即 LOD 值, 对油橄榄 4 个品种部分子代真实父本进行鉴定, 其中‘城固 32’和‘皮瓜尔’子代的主要父本为‘豆果’, ‘豆果’和‘贺吉布兰克’子代的主要父本为‘小苹果’。[结论] 所选高多态性和高累积排除概率的 SSR 位点适用于对油橄榄品种子代进行父本分析, 为 4 个品种部分子代鉴定出真实父本, 其中仅‘城固 32’具有一定的自交亲和性, 这为品种建园时授粉品种的选择和配置提供重要依据。

关键词: 油橄榄; 栽培品种; 子代; 父本分析; SSR 标记

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)03-0030-09

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 为木犀科 (Oleaceae) 木犀属 (*Olea* L.) 常绿乔木, 是世界著名木本油料树种, 主要分布于地中海地区, 由其新鲜初熟或成熟果实冷榨而成的橄榄油, 富含单不饱和脂肪酸和抗氧化物质, 营养和保健功能越来越受到人们的认可^[1-2]。

油橄榄为风媒异花授粉, 不同品种自交和杂交亲和性仍没有得到充分地研究和揭示, 如对栽培品种“Moraiolo”和“Manzanillo”自交亲和性的研究, 不同学者得出的结论完全相反^[3]。Mekuria 等^[4]认为, 实验条件不同甚至参试品种鉴定不准确或名称混淆, 自交亲和性的研究都有可能出现截然不同的结果。人工套袋授粉, 显微观察花粉管萌发、生

长, 统计坐果率, 是油橄榄品种亲和性研究的常规方法^[5-6], 但这种方法很难避免外来花粉污染^[7], 袋内微环境的改变及果实自然脱落都会影响对套袋真实坐果率的判断^[8]。采用分子标记方法进行亲和性分析准确性较高, 其中, SSR 标记具有共显性、高多态性的特点, 在油橄榄遗传学研究中得到广泛应用^[3,9-13]。

20 世纪 50 年代以来, 我国自国外引种油橄榄品种 150 多个, 在甘肃、四川、重庆、云南等地推广种植, 目前栽培面积近 11 万 hm^2 , 经济、生态和社会效益显著; 然而, 我国早期营建的很多油橄榄品种园缺乏明确的授粉品种配置技术, 坐果率低、挂果少、产量低等现象较为普遍。甘肃武都油

收稿日期: 2019-03-05 修回日期: 2020-01-18

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (CAFYBB2017ZA004-5)

* 通讯作者: 张建国. E-mail: zhangjg@caf.ac.cn

橄榄品种园是我国收集保存油橄榄种质资源较丰富的品种园,本研究以该品种园收集保存的 114 份油橄榄种质作为候选父本,选择园内 4 个主要栽培品种,利用 SSR 标记对品种子代的真实父本进行鉴定,分析品种亲和性,探索适宜的授粉品种,以期作为油橄榄品种园中品种配置提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甘肃省陇南市武都地区自 1978 年开始引种油橄榄,1992 年建立近 7 hm² 油橄榄丰产示范园^[14]。目前,武都油橄榄品种园已收集、保存油橄榄种质 114 份(114 份种质信息表略),包括油橄榄亚种尖叶木犀榄(*O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. ex G. Don) Cif.) 和变种金叶木犀榄(*O. europaea* subsp. *cuspidata* var. *chrysophylla* Lam.)。

品种园内不同种质材料混合种植,株行距约 3 m×3 m,植株长势良好。选择“城固 32”(“Chenggu 32”)、“豆果”(“Arbequina”)、“贺吉布兰克”(“Hojiblanca”)和“皮瓜尔”(“Picual”)4 个主要栽培品种,于果实成熟期分别从不同品种植株中部的 4 个方位,随机采摘新鲜果实 5 颗以上,其中,“城固 32”30 颗,“豆果”25 颗,“贺吉布兰克”20 颗,“皮瓜尔”20 颗。用自封袋将果实分装带回实验室,果肉自然软化后,去除果皮,剥出的种子保存在 4℃ 冰箱中备用。

从每份种质的正常结实植株上采集新鲜叶片,立即装在样品袋中进行硅胶干燥,带回实验室于 4℃ 冰箱中储藏备用。样品采集时,详细登记每份种质的原始名称、原产地和引种地等信息。原始记录名称缺失或不确定的 27 份种质,采用 UC1、UC2、UC3、…、UC27 进行编号。

材料标本凭证保存于中国林业科学研究院林业研究所国家林业和草原局林木培育重点实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 叶片 DNA 提取:利用天根生化科技(北京)有限公司生产的植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)提取油橄榄叶片全基因组 DNA,操作参照说明书。

种胚 DNA 提取:使用同款 DNA 提取试剂盒,按照产品说明向 GP1 缓冲液中加入定量的 β-巯基乙醇,65℃ 水浴备用。将油橄榄种子从硬质

内果皮中剥离出,浸泡于 65℃ 水中,去除种皮和胚乳,切取 1/2 种胚置于 1.5 mL 离心管中,加入约 300 μL 备用 GP1 缓冲液,利用 TIANGEN- OSEY30 高速组织研磨器研磨至样品完全粉碎,再向研磨样品加入备用 GP1 缓冲液约 400 μL,轻摇混匀,置于 65℃ 水浴锅中水浴 40~60 min,期间每 10 min 取出重新混匀,后续操作参照说明书。

1.2.2 引物合成 14 对 SSR 引物根据文献^[15-19]中记载的序列信息,由生工生物工程(上海)股份有限公司提供合成服务,其中,5'端分别用 6-FAM、HEX、TMR 和 ROX 荧光进行标记(表 1)。

1.2.3 PCR 扩增测序 PCR 扩增采用 20 μL 反应体系,包括 7.9 μL ddH₂O,10 μL PCR Mix(含 DNA polymerase、dNTPs 和 Buffer),正反向引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.8 μL,以及 0.5 ng 模板 DNA。扩增程序:94℃ 预变性,4 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 左右退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,10 个循环;94℃ 变性 30 s,55℃ 左右退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,26 个循环;72℃ 延伸 10 min;10℃ 保存。退火温度因引物不同而异。使用 ABI Veriti96 PCR 仪进行 PCR 扩增,产物送北京擎科新业有限公司进行 Sanger 法测序。

1.2.4 数据处理 采用 GeneMapper 4.0 软件(Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom),按照使用说明书,设置参数,进行基因分型。分型的结果以 Excel 表格输出。

建立母本、候选父本(叶片)和子代(种胚)基因型数据库,使用 Cervus 3.0 软件计算等位基因频率、期望杂合度、观测杂合度、多态信息含量、哑等位基因以及非父排除概率等参数^[20-21]。运行 Simulation 程序中的 paternity 子程序,输入等位基因频率分析文件,模拟 10 000 次亲子鉴定。运行 Parentage Analysis 程序中的 paternity 子程序,输入子代及候选父本基因型文件、等位基因频率分析和模拟分析文件,计算候选父本基因型似然对数比(LOD)值和不同置信水平(80% 和 95%)Delta 值(最大和次大 LOD 值的差值),根据 LOD 值大小判定亲子关系。

2 结果与分析

2.1 油橄榄品种种子发育及种胚获取

4 个油橄榄品种共采集果实 95 颗,种子败育现象在品种间普遍存在,“豆果”种子发育正常果实

表 1 14 对 SSR 引物序列信息

Table 1 Sequence information of the 14 SSR markers

位点Locus	引物序列Primer sequence (5'-3')	重复单元Repeat motif	标记荧光Fluorescent
ssrOeUA-DCA3	F: CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC	(GT) ₁₉	6-FAM
	R: TGCTTTTGTGCGTGTGAGATGTTG		
ssrOeUA-DCA9	F: AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTG	(GT) ₂₃	6-FAM
	R: GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC		
ssrOeUA-DCA11	F: GATCAAACACTGCGACGAGAGAG	(GA) ₂₆ (GGGA) ₄	ROX
	R: TTGTCTCAGTGAACCCTTAAACC		
ssrOeUA-DCA15	F: GATCTTGTCTGTATATCCACAC	(CA) ₃ G(AC) ₁₄	6-FAM
	R: TATACCTTTTCCATCTTGACGC		
ssrOeUA-DCA16	F: TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	HEX
	R: TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC		
DCA18	F: AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC	(CA) ₄ (CT) ₁ (CA) ₃ (GA) ₁₉	TMR
	R: GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC		
UDO99-011	F: TGACTCCCTTTAAACTCATCAGG	(CT) ₇ (CA) ₁₀ (CT) ₂ (CA) ₂ 2CT(CA) ₂ CT(CA) ₉	6-FAM
	R: TGCGCATGTAGATGTGAATATG		
UDO99-019	F: TCCCTTGTAGCCTCGTCTTG	(GT) ₂₀ (AT) ₅	ROX
	R: GGCCTGATCATCGATACCTC		
UDO99-024	F: GGATTTATTA AAAAGCAAACATACAAA	(CA) ₁₁ (TA) ₂ (CA) ₄	HEX
	R: CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA		
UDO99-043	F: TCGGCTTTACAACCCATTTC	(GT) ₁₂	TMR
	R: TGCCAATTATGGGGCTAACT		
GAPU59	F: CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA	(CT) ₉	ROX
	R: CAAAGGTGCACCTTCTCTCG		
GAPU71B	F: GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA	(AG) ₇ (AAG) ₈	6-FAM
	R: ACAACAAATCCGTACGCTTG		
GAPU101	F: CATGAAAGGAGGGGGACATA	(GA) ₈ (GA) ₃ (AG) ₃	HEX
	R: GGCAC TTGTTGTGCGAGATTG		
GAPU 103	F: TGAATTTAACTTTAAACCCACACA	(TC) ₃₂	TMR
	R: GCATCGCTCGATTTTTATCC		

比例最高（96%），“贺吉布兰克”最低（70%）（表 2）。

油橄榄种子发育过程中，2 个心皮内分别着生 2 个胚珠^[22]，后期通常只有 1 个胚珠发育成为种子^[23]。通过对不同品种种子解剖发现，“城固 32”和“贺吉布兰克”果实内具有 2 粒发育正常种子的现象（图 1），其中，“贺吉布兰克”果实具 2 粒发育正常种子的比例达 25%（表 2）。

4 个品种共获得 88 粒发育正常的种子，具 2 粒发育正常种子的仅取其中 1 粒，共剥离出 80 个种胚用于父本鉴定分析。

2.2 父本鉴定参数检测

2.2.1 等位基因频率 14 个 SSR 位点的平均等位基因数 16.1 个（表 3），其中，DCA9 位点上的等位基因数目最多（29 个），GAPU59 位点上等位基因数目最少（8 个），均满足利用 SSR 标记进行父本分析所需等位基因数要求^[24]。UDO99-019 位点 132 bp 的等位基因频率最高（0.645 9），而 GAPU101 位点 194、216、245 和 247 bp 的等位基因频率最低，均为 0.002 6。

2.2.2 平均杂合度 14 个 SSR 位点的观测杂合度（*Ho*）和期望杂合度（*He*）均值分别为 0.788 0

表 2 油橄榄不同品种果实种子发育情况
Table 2 Seed development of different olive cultivars

种质编号 Germplasm number	品种Cultivar	果实数量 Fruit number/颗	种子发育正常的果实数量 Number of fruits with well-developed seeds/颗	种子发育正常的果实比例 Proportion of fruits with well-developed seeds/%	具2粒发育正常种子的 果实数量 Number of bi-seeded fruits/颗	具2粒发育正常种子的 果实比例 Proportion of bi-seeded fruits/%
105	‘豆果’‘Arbequina’	25	24	96	0	0
108	‘皮瓜尔’‘Picual’	20	16	80	0	0
79	‘城固32’‘Chenggu 32’	30	26	87	3	10
106	‘贺吉布兰克’ ‘Hojiblanca’	20	14	70	5	25



注: (a)‘贺吉布兰克’果实内具有 2 粒发育正常的种子; (b)‘豆果’果实内仅有 1 粒发育正常的种子。
Notes: (a) shows two well-developed seeds in ‘Hojiblanca’ fruit; (b) shows only one well-developed seed in ‘Arbequina’ fruit.

图 1 油橄榄不同品种种子发育比较

Fig. 1 Comparison of seed development between different olive cultivars

和 0.786 3, 变异范围分别为 0.514 0~0.995 0 和 0.551 0~0.926 0 (表 4)。Ho 和 He 均值相近, 表明油橄榄品种受选择及近交等因素的影响较小; 平均杂合度较高, 表明油橄榄品种遗传变异大, 环境适应能力强。

2.2.3 多态信息含量及排除概率 通常认为, 多态信息含量 (PIC) >0.500 0 时位点为高度多态, 0.250 0<PIC<0.500 0 时位点为中度多态, PIC<0.250 0 时则为低度多态位点^[25]。14 个 SSR 位点的 PIC 值均大于 0.500 0 (表 4), 均为高度多态位点。平均多态信息含量为 0.758 8, 其中, UDO99-019 位点最低 (0.520 0), GAPU103 位点最高 (0.918 0)。14 个 SSR 位点具有丰富的多态性, 能够为研究提供足够的多态信息。

当双亲基因型皆未知时, 单个 SSR 位点的非父排除概率 (NE-1P) 变化范围为 0.268~0.827, 均值 0.550; 当一个亲本基因型已知时, 单个 SSR 位点的非父排除概率 (NE-2P) 变化范围为 0.155~0.664, 均值 0.387; 当双亲基因型已知时, 单个 SSR 位点的非父排除概率 (NE-PP) 变化范围为 0.040~0.504, 均值 0.212 (表 5)。

依据 PIC 值由高至低依次累积计算 14 个 SSR 位点的排除概率, 随着 SSR 位点数增加, 累积排除概率增大 (图 2)。对于单亲已知类 NE-2P, 基于前 9 个 SSR 位点累积排除概率 0.958, 基于前 12 个 SSR 位点累积排除概率 0.994, 而基于全部 14 个 SSR 位点累积排除概率高达 0.999。

2.2.4 哑等位基因频率 哑等位基因影响遗传分析结果, 数据处理时需要将哑等位基因频率偏高的位点删除^[26]。对 14 个 SSR 位点哑等位基因的检测结果表明, 各位点均存在一定的哑等位基因, 但频率较低, 均小于 0.080 0 (表 4), 可用于亲本鉴定分析^[26]。

2.3 父本鉴定

在置信度 80% 水平, 4 个品种共计 29 个子代鉴定出候选父本 (表 6), 其中“城固 32”13 个 (鉴定率 50%), “豆果”7 个 (鉴定率 29%), “贺吉布兰克”5 个 (鉴定率 36%), “皮瓜尔”4 个 (鉴定率 25%)。

在置信度 95% 水平, “城固 32”、“豆果”和“皮瓜尔”子代主要候选父本分别为“豆果” (占 60%)、“小苹果” (占 67%) 以及“豆果” (占

表 3 14 个 SSR 位点等位基因及基因频率
Table 3 Number of alleles and allele frequencies of the 14 SSR loci

位点 Locus	等位基因数 Number of alleles	等位基因及其频率Allele and allele frequency
DCA3	13	231(0.081 1); 232(0.060 8); 235(0.003 4); 237(0.111 5); 239(0.128 4); 243(0.239 9); 245(0.054 1); 247(0.013 5); 249(0.131 8); 252(0.016 9); 253(0.152 0); 255(0.003 4); 256(0.003 4)
DCA9	29	123(0.002 8); 144(0.002 8); 157(0.002 8); 158(0.002 8); 159(0.005 5); 162(0.287 3); 163(0.002 8); 165(0.024 9); 169(0.002 8); 172(0.124 3); 175(0.013 8); 177(0.002 8); 179(0.002 8); 181(0.049 7); 182(0.002 8); 183(0.138 1); 185(0.019 3); 187(0.002 8); 191(0.035 9); 193(0.071 8); 195(0.005 5); 201(0.011 0); 203(0.030 4); 205(0.127 1); 207(0.016 6); 209(0.002 8); 211(0.002 8); 217(0.002 8); 221(0.002 8)
DCA11	18	129(0.029 7); 130(0.002 7); 132(0.024 3); 133(0.132 4); 135(0.002 7); 138(0.008 1); 140(0.002 7); 143(0.048 6); 144(0.310 8); 147(0.005 4); 151(0.073 0); 164(0.086 5); 172(0.002 7); 174(0.005 4); 178(0.021 6); 180(0.043 2); 182(0.183 8); 186(0.016 2)
DCA15	13	238(0.002 8); 243(0.002 8); 244(0.041 4); 245(0.447 5); 246(0.002 8); 247(0.013 8); 250(0.002 8); 255(0.013 8); 262(0.016 6); 263(0.008 3); 264(0.433 7); 266(0.002 8); 267(0.011 0)
DCA16	21	122(0.154 9); 123(0.097 8); 126(0.002 7); 132(0.002 7); 144(0.002 7); 146(0.024 5); 149(0.203 8); 152(0.005 4); 155(0.171 2); 156(0.027 2); 157(0.010 9); 162(0.057 1); 165(0.002 7); 171(0.019 0); 174(0.179 3); 176(0.013 6); 177(0.002 7); 181(0.002 7); 199(0.008 2); 201(0.005 4); 205(0.005 4);
DCA18	15	162(0.023 9); 163(0.005 3); 165(0.013 3); 166(0.005 3); 169(0.087 8); 170(0.143 6); 172(0.122 3); 174(0.016 0); 176(0.255 3); 178(0.199 5); 180(0.087 8); 184(0.018 6); 186(0.002 7); 187(0.013 3); 197(0.005 3)
UDO99-011	19	92(0.066 3); 100(0.008 3); 101(0.265 2); 102(0.069 1); 103(0.002 8); 104(0.005 5); 109(0.011 0); 110(0.140 9); 112(0.071 8); 114(0.163 0); 117(0.016 6); 120(0.074 6); 121(0.030 4); 123(0.019 3); 126(0.027 6); 127(0.019 3); 128(0.002 8); 142(0.002 8); 151(0.002 8)
UDO99-019	11	98(0.013 5); 101(0.008 1); 102(0.140 5); 132(0.645 9); 133(0.027 0); 146(0.002 7); 147(0.002 7); 155(0.002 7); 158(0.054 1); 164(0.002 7); 170(0.100 0);
UDO99-024	11	163(0.012 1); 166(0.087 9); 170(0.030 3); 171(0.048 5); 178(0.063 6); 180(0.078 8); 184(0.060 6); 185(0.009 1); 186(0.533 3); 188(0.024 2); 202(0.051 5)
UDO99-043	21	135(0.332 4); 145(0.002 7); 146(0.324 3); 153(0.002 7); 160(0.013 5); 161(0.118 9); 162(0.086 5); 175(0.008 1); 176(0.032 4); 179(0.016 2); 182(0.002 7); 183(0.005 4); 185(0.002 7); 186(0.008 1); 206(0.005 4); 210(0.002 7); 212(0.010 8); 214(0.008 1); 216(0.002 7); 219(0.010 8); 221(0.002 7);
GAPU59	8	209(0.174 9); 214(0.412 6); 218(0.010 9); 219(0.265 0); 222(0.019 1); 224(0.103 8); 230(0.002 7); 241(0.010 9);
GAPU71B	10	114(0.010 9); 116(0.002 7); 117(0.144 8); 120(0.316 9); 122(0.106 6); 123(0.038 3); 126(0.109 3); 129(0.002 7); 134(0.002 7); 140(0.26 5)
GAPU101	13	184(0.128 9); 190(0.034 2); 192(0.157 9); 194(0.002 6); 196(0.007 9); 198(0.181 6); 200(0.250 0); 204(0.005 3); 206(0.118 4); 216(0.002 6); 218(0.105 3); 245(0.002 6); 247(0.002 6)
GAPU103	23	120(0.009 2); 122(0.006 1); 137(0.082 8); 140(0.009 2); 152(0.064 4); 159(0.003 1); 161(0.070 6); 162(0.009 2); 164(0.042 9); 166(0.003 1); 170(0.006 1); 174(0.033 7); 176(0.138 0); 178(0.033 7); 184(0.061 3); 188(0.024 5); 190(0.012 3); 192(0.095 1); 198(0.122 7); 199(0.036 8); 206(0.052 1); 212(0.064 4); 245(0.018 4)

表 4 14 个 SSR 位点在群体中的多态性检测
Table 4 Polymorphic information of the 14 SSR loci in the population

位点Locus	个体数Number of individuals	观测杂合度Observed heterozygosity (<i>Ho</i>)	期望杂合度Expected heterozygosity (<i>He</i>)	多态信息含量Polymorphism information content (<i>PIC</i>)	哑等位基因概率Null allele frequency
DCA3	148	0.838 0	0.862 0	0.844 0	0.008 5
DCA9	181	0.901 0	0.858 0	0.842 0	−0.029 6
DCA11	185	0.816 0	0.835 0	0.816 0	0.009 8
DCA15	181	0.514 0	0.611 0	0.532 0	0.072 7
DCA16	184	0.734 0	0.860 0	0.842 0	0.078 2
DCA18	188	0.872 0	0.845 0	0.824 0	−0.015 8
UDO991-11	181	0.856 0	0.863 0	0.847 0	−0.002 0
UDO99-019	185	0.584 0	0.551 0	0.520 0	−0.034 1
UDO99-024	165	0.618 0	0.689 0	0.670 0	0.023 2
UDO99-043	185	0.995 0	0.763 0	0.727 0	−0.149 1
GAPU59	183	0.628 0	0.720 0	0.673 0	0.064 0
GAPU71B	183	0.891 0	0.786 0	0.752 0	−0.067 8
GAPU101	190	0.895 0	0.839 0	0.816 0	−0.032 9
GAPU103	163	0.890 0	0.926 0	0.918 0	0.017 2
均值Mean	179	0.788 0	0.786 3	0.758 8	—

注：“—”表示无数据。下同。
Note: No data are reported by “—”. The same below.

表 5 14 个 SSR 位点的非父排除概率
Table 5 Non-exclusion probability of the 14 SSR loci

位点 Locus	亲本基因型未知的非父排除概率 Average non-exclusion probability for one candidate parent (NE-1P)	已知一个亲本基因型的非父排除概率 Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex (NE-2P)	双亲基因型已知的非父排除概率 Average non-exclusion probability for a candidate parent pair (NE-PP)
GAPU103	0.268	0.155	0.040
UDO991-11	0.429	0.272	0.106
DCA3	0.441	0.280	0.116
DCA9	0.437	0.278	0.109
DCA16	0.444	0.284	0.119
DCA18	0.477	0.311	0.139
DCA11	0.487	0.319	0.139
GAPU101	0.497	0.326	0.153
GAPU71B	0.595	0.417	0.231
UDO99-043	0.621	0.443	0.252
GAPU59	0.694	0.519	0.334
UDO99-024	0.684	0.491	0.269
DCA15	0.799	0.664	0.504
UDO99-019	0.827	0.653	0.460
均值 Mean	0.550	0.387	0.212

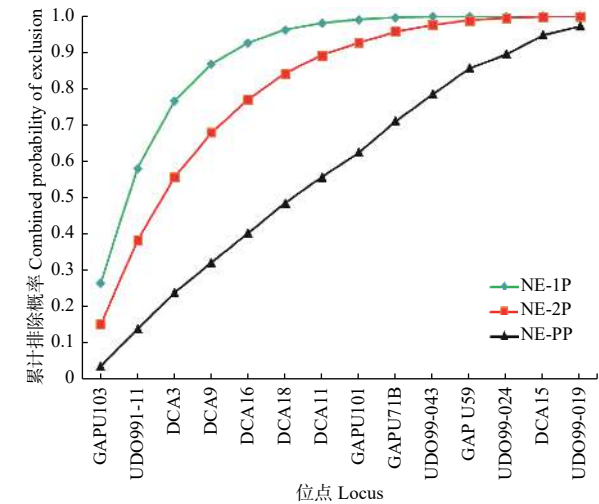


图 2 14 个 SSR 位点的累积排除概率
Fig. 2 Combined exclusion probability of the 14 SSR loci

100%)，而“贺吉布兰克”子代鉴定出的候选父本仅 1 个，为“小苹果·塞维利亚”。

3 讨论

多态信息含量 (PIC) 是衡量基因丰富度的重要指标，等位基因越多，多态性越丰富。本研究

中,14 个 SSR 位点 PIC 均值 0.758 8，多态性高，哑等位基因频率检测结果也表明各 SSR 位点可用于油橄榄品种子代的父本分析。基于遗传排除法 (Genetic exclusion) [27] 和 Cervus 3.0 软件[28-30]，利用这 14 个 SSR 标记对我国甘肃武都油橄榄品种园“城固 32”、“豆果”、“贺吉布兰克”以及“皮瓜尔”4 个主要栽培品种子代进行父本分析，检测各子代与候选父本之间的亲缘关系，在单亲基因型已知下，累积排除概率高达 99%，可认为候选父本和子代间的亲子关系成立。通过比较子代、母本和候选父本的基因型，计算每个候选父本的 LOD 值，从候选父本中为部分子代鉴定出真实亲本。

对油橄榄 4 个品种 80 个子代父本分析结果表明，在 80% 置信水平可为 29 个子代确定候选父本，即花粉来源，鉴定率与其他学者对油松 (Pinus tabulaeformis Carr.) [31]、马尾松 (P. massoniana Lamb.) [32]、青冈 (Cyclobalanopsis glauca (Thunb.) Oerst.) [33] 等树种的研究结果相似。

4 个油橄榄品种的子代检测出的候选父本相对集中，共 14 个品种，仅占全部候选父本的 12%，表明品种园内仅有少数品种的花粉对子代的贡献较大。何田华等[34]认为,利用排除法进行亲本分析时，群体中候选亲本数量不宜大于 100，否则很难为大多数子代确定亲本来源。本研究中,候选父本多达 114 个，这可能是只有少分子代的父本被鉴定出的原因之一，而不同品种间的花期同步性、品种园内小区块的品种配置等因素可能也会影响对子代花粉来源的分析和鉴定，需要在今后研究中予以关注。

油橄榄多数品种存在自交不亲和现象[4]，对品种自交亲和性和品种间杂交亲和性的研究结果受环境条件等因素的影响[35]。本研究中，4 个油橄榄品种仅在“城固 32”子代中检测到来自品种自身的花粉，表明“城固 32”具有自交亲和性，王笑山等[36]对陕西城固油橄榄园主要品种自花授粉坐果率的研究也表明“城固 32”具有一定的自交结实能力。“豆果”、“贺吉布兰克”和“皮瓜尔”子代没有检测到品种自身花粉，为自交不亲和品种。其它学者对我国四川凉山州[13]、意大利西西里岛[35,37] 油橄榄品种亲和性的研究结果也表明“豆果”自交不亲和。

“城固 32”子代候选父本 60% 为“豆果”（置信度 95%），表明“豆果”是其主要的花粉贡献品种。

表 6 油橄榄 4 个品种子代父本分析结果

Table 6 Paternity analysis result of the four olive cultivars progenies

子代编号 Progeny number	母本编号 Female parent number	母本名称 Female parent name	候选父本编号 Candidate paternal parent number	候选父本名称 Candidate paternal parent name	LOD值 Trio LOD score	Delta值 Trio Delta	置信度 Trio confidence
79-1	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	105	‘豆果’‘Arbequina’	5.79E+00	5.79E+00	*
79-2	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	107	‘科尼卡’‘Cornicabra’	3.53E+00	3.53E+00	*
79-4	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	100	‘云台14’‘Yuntai 14’	3.18E+00	3.16E+00	*
79-6	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	16	‘城固32’‘Chenggu 32’	1.02E+00	7.32E-01	+
79-14	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	3.71E+00	3.71E+00	*
79-15	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	UC5	—	1.65E+00	1.65E+00	*
79-18	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	105	‘豆果’‘Arbequina’	3.41E+00	3.41E+00	*
79-21	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	105	‘豆果’‘Arbequina’	1.60E+00	1.60E+00	*
79-24	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	UC17	—	4.09E+00	8.97E-01	+
79-26	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	9	‘莱星’‘Leccino’	3.87E+00	6.74E-01	+
79-27	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	105	‘豆果’‘Arbequina’	4.28E+00	4.28E+00	*
79-28	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	105	‘豆果’‘Arbequina’	1.17E+00	1.17E+00	*
79-29	79	‘城固32’‘Chenggu 32’	105	‘豆果’‘Arbequina’	4.99E+00	4.99E+00	*
105-4	105	‘豆果’‘Arbequina’	109	‘小苹果’‘Manzanilia’	2.91E+00	2.79E+00	*
105-5	105	‘豆果’‘Arbequina’	53	‘小苹果·塞维利亚’‘Manzanilia De Sevilla’	1.34E+00	1.34E+00	*
105-10	105	‘豆果’‘Arbequina’	104	‘小苹果’‘Manzanilia’	3.81E+00	1.30E+00	*
105-14	105	‘豆果’‘Arbequina’	36	‘配多灵’‘Pendolino’	3.20E-01	3.20E-01	+
105-16	105	‘豆果’‘Arbequina’	5	‘城固32’‘Chenggu 32’	2.87E+00	2.87E+00	*
105-19	105	‘豆果’‘Arbequina’	104	‘小苹果’‘Manzanilia’	1.20E+00	1.20E+00	*
105-20	105	‘豆果’‘Arbequina’	104	‘小苹果’‘Manzanilia’	3.62E+00	3.62E+00	*
106-2	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	98	金叶木犀榄 <i>O. europaea</i> subsp. <i>cuspidata</i> var. <i>chrysophylla</i>	2.12E-01	2.12E-01	+
106-4	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	104	‘小苹果’‘Manzanilia’	3.25E+00	3.39E-01	+
106-6	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	104	‘小苹果’‘Manzanilia’	1.48E+00	5.75E-01	+
106-7	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	101	‘阿尔波萨纳’‘Arbosana’	8.28E-01	8.28E-01	+
106-13	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	53	‘小苹果·塞维利亚’‘Manzanilia De Sevilla’	2.86E+00	2.86E+00	*
108-1	108	‘皮瓜尔’‘Picual’	105	‘豆果’‘Arbequina’	5.36E+00	5.36E+00	*
108-6	108	‘皮瓜尔’‘Picual’	105	‘豆果’‘Arbequina’	1.43E+00	1.43E+00	*
108-9	108	‘皮瓜尔’‘Picual’	106	‘贺吉布兰克’‘Hojiblanca’	3.86E+00	1.03E+00	+
108-13	108	‘皮瓜尔’‘Picual’	101	‘阿尔波萨纳’‘Arbosana’	1.10E+00	1.10E+00	+

注: *代表置信度为95%; +代表置信度为80%。

Notes: * represents a 95% confidence level; + represents a 80% confidence level.

同时，在“豆果”子代候选父本中检测出“城固 32”（置信度 95%），表明这 2 个品种可互相作为授粉品种，这与对四川凉山州油橄榄品种适配性的研究结果一致^[13]。此外，在“豆果”和“贺吉布兰克”的子代候选父本中，“小苹果”的比例分别为 57% 和 40%（置信度 80% 及 95%），表明可以将“小苹

果”作为“豆果”和“贺吉布兰克”建园的共同授粉品种。另外，“贺吉布兰克”子代候选父本中检测出油橄榄变种金叶木犀榄（置信度 80%），表明以金叶木犀榄为父本，对“贺吉布兰克”实施杂交制种和遗传改良具有可行性。

研究发现“城固 32”和“贺吉布兰克”果实内具

有 2 粒发育正常的种子,且在后者果实中的比例达 25%,而“豆果”和“皮瓜尔”果实内仅有 1 粒发育正常的种子。Cuevas 等^[23]研究表明,“贺吉布兰克”果实(14%)中同样具有 2 粒发育正常的种子,“皮瓜尔”中没有此现象,但在“豆果”中发现了少量果实(4%)具 2 粒发育正常的种子。Farinelli 等^[37]研究表明,在一些油橄榄品种中,具 2 粒发育正常种子的果实比仅 2 粒种子的果实大。因此,今后应加强对果实具 2 粒发育正常种子品种的研究,比较具 2 粒种子与 1 粒种子果实的表型差异,通过父本分析确定花粉来源,继而探索授粉品种对油橄榄果实种子发育的影响。

4 结论

本研究将我国甘肃武都油橄榄品种园 114 份种质作为候选父本,利用 14 个 SSR 标记对园内 4 个主要栽培品种“城固 32”、“豆果”、“贺吉布兰克”和“皮瓜尔”的子代进行父本分析,结果表明 14 个 SSR 位点均为高多态性位点,对于单亲已知类 NE-2P,其累积排除概率高达 0.999,这为油橄榄品种子代父本鉴定提供了重要的遗传标记选择。经检测,“城固 32”和“皮瓜尔”子代的主要父本为“豆果”,而“豆果”和“贺吉布兰克”子代的主要父本为“小苹果”,同时,4 个品种仅“城固 32”具有一定的自交亲和性,这为今后油橄榄建园时的品种配置设计提供了基础依据。

参考文献:

- [1] Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, *et al.* Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378(14): e34.
- [2] Tarchoun I, Sgherri C, Eddouzi J, *et al.* Olive leaf addition increases olive oil nutraceutical properties[J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 545.
- [3] Mookerjee S, Guerin J, Collins G, *et al.* Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(6): 1174-1182.
- [4] Mekuria G T, Collins G G, Sedgley M. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars[J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1999, 74(3): 309-314.
- [5] Díaz A, Martín A, Rallo P, *et al.* Cross-compatibility of the parents as the main factor for successful olive breeding crosses[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2007, 132(6): 830-835.
- [6] Wu S B, Collins G, Sedgley M. Sexual compatibility within and between olive cultivars[J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2002, 77(6): 665-673.
- [7] De la Rosa R, James C M, Tobutt K R. Using microsatellites for paternity testing in olive progenies[J]. *HortScience*, 2004, 39(2): 351-354.
- [8] Rallo L, Cuevas J, Rapoport H F. Fruit set pattern in self-and open-pollinated olive cultivars[C]//Rallo L, Caballero J M, Fernández-Escobar R. *International symposium on olive growing*. Cordoba: ISHS Acta Horticulturae, 1990: 219-222.
- [9] Díaz A, Martín A, Rallo P, *et al.* Self-incompatibility of ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive assessed by SSR markers[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2006, 131(2): 250-255.
- [10] Shemer A, Biton I, Many Y, *et al.* The olive cultivar ‘Picual’ is an optimal pollen donor for ‘Barnea’ [J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 172(1057): 278-284.
- [11] Cáceres M E, Ceccarelli M, Pupilli F, *et al.* Obtainment of inter-sub-specific hybrids in olive (*Olea europaea* L.)[J]. *Euphytica*, 2015, 201(2): 307-319.
- [12] 秦倩. 武都地区油橄榄品种适应性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [13] 王楠楠. 凉山州油橄榄品种适应性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016.
- [14] 徐纬英. 中国油橄榄种质资源与利用[M]. 长春: 长春出版社, 2001.
- [15] Sefc K M, Lopes M S, Mendonça D, *et al.* Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(8): 1171-1173.
- [16] Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, *et al.* Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.)[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2002, 104(2-3): 301-307.
- [17] 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 & Applied Genetics*, 2002, 104(2-3): 223-228.
- [18] Pasqualone A, Montemurro C, Caponio F, *et al.* Multiplex amplification of DNA microsatellite markers to fingerprint olive oils from single cultivars[J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2003, 12(Suppl. 2): 96-99.
- [19] Muzzalupo I, Stefanizzi F, Perri E. Evaluation of olives cultivated in Southern Italy by simple sequence repeat markers[J]. *Hortscience*, 2009, 44(3): 582-588.
- [20] Marshall T, Slate J, Kruuk L, *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(5): 639-655.
- [21] Slate J, Marshall T, Pemberton J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(6): 801-808.
- [22] Rosati A, Caporali S, Hammami S B M, *et al.* Tissue size and cell number in the olive (*Olea europaea*) ovary determine tissue growth and partitioning in the fruit[J]. *Functional Plant Biology*, 2012, 39(7): 580-587.
- [23] Cuevas J, Oller R. Olive seed set and its impact on seed and fruit weight[C]//Vitagliano C, Martelli G P. *IV International symposium*

- on olive growing. Valenzano: ISHS Acta Horticulturae, 2002: 485-488.
- [24] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds[C]//Smith C. Proceedings of the 5th world congress on genetics applied to livestock production. Guelph: Department of Animal & Poultry Science, University of Guelph, 1994: 501-508.
- [25] Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314.
- [26] 文亚峰, 韩文军, 谢伟东, 等. 微卫星标记中的无效等位基因[J]. 生物多样性, 2013, 21(1): 117-126.
- [27] Jones A G, Ardren W R. Methods of parentage analysis in natural populations[J]. Molecular Ecology, 2003, 12(10): 2511-2523.
- [28] 孙楠, 李琪, 于红, 等. 利用微卫星标记的蚌蚶混交家系鉴定[J]. 中国海洋大学学报, 2015, 45(9): 42-48.
- [29] 陈亮, 汪登强, 何勇凤, 等. 基于微卫星多重PCR技术的长鳍吻鲷亲子鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(9): 1526-1537.
- [30] 殷彬, 岳书俭, 俞英, 等. 奶牛分子系谱构建或亲权鉴定的微卫星标记筛选[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(4): 595-604.
- [31] 张冬梅, 孙佩光, 沈熙环, 等. 油松种子园自由授粉与控制授粉种子父本分析[J]. 植物生态学报, 2009, 33(2): 302-310.
- [32] 艾畅, 徐立安, 赖焕林, 等. 马尾松种子园的遗传多样性与父本分析[J]. 林业科学, 2006, 42(11): 146-150.
- [33] 陈小勇, 宋永昌. 自然定居青冈幼苗的亲本分析[J]. 植物科学学报, 2000, 18(3): 174-180.
- [34] 何田华, 葛颂. 植物种群交配系统、亲本分析以及基因流动研究[J]. 植物生态学报, 2001, 25(2): 144-154.
- [35] Marchese A, Marra F P, Costa F, *et al.* An investigation of the self- and inter-incompatibility of the olive cultivars ‘Arbequina’ and ‘Koroneiki’ in the Mediterranean climate of Sicily[J]. Australian Journal of Crop Science, 2016, 10(1): 88-93.
- [36] 王笑山, 谈克德. 城固油橄榄中试园主栽和授粉品种花期、花型及可配性测定结果[J]. 林业科技通讯, 1985(12): 1-4.
- [37] Farinelli D, Tombesi A, Hassani D. Paternal and maternal effects on seed characteristics of olive cultivars[C]//Özkaya M T, Lavee S, Ferguson L. V International symposium on olive growing. Izmir: ISHS Acta Horticulturae, 2008: 121-125.

Paternity Analysis of Main Olive Cultivars Progenies Based on SSR Markers

SHAO Wen-hao^{1,2}, WANG Zhao-shan¹, ZHANG Jian-guo¹

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of National Forestry and Grassland Administration, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Paternity analysis of main olive cultivars progenies in Wudu Olive Orchard from Gansu province was carried out to identify the true paternal parent, explore the compatibility, and provide references for the selection of pollination cultivars in the orchard. [Method] 114 germplasm accessions from Wudu Olive Orchard were used as candidate paternal parents. Based on 14 pairs of fluorescence-labelled SSR markers, Cervus software was used to detect the parameters. True paternal parent identification of the four cultivars progenies (‘Chenggu 32’, ‘Arbequina’, ‘Hojiblanca’ and ‘Picual’) was performed. [Result] The 14 SSR loci were highly polymorphic and the cumulative exclusion probability increased with the number of loci. For the single parent known type NE-2P, the cumulative exclusion probability of the 14 loci was as high as 0.999. By comparing the genotypes of the progeny, the female parent and the candidate paternal parent, the LOD (log of likelihood ratio) values of each candidate paternal parent were calculated, and the identification of the true paternal parents of the partial progenies of the four cultivars was completed. The main paternal parent of the ‘Chenggu 32’ and ‘Picual’ progenies was ‘Arbequina’, while the main paternal parent of the ‘Arbequina’ and ‘Hojiblanca’ progenies was ‘Manzanilla’. [Conclusion] The SSR loci with characteristics of high polymorphism and high cumulative exclusion probability selected in the study are suitable for paternity analysis of olive cultivars progenies. The true paternal parents were identified for some of the four cultivars progenies and only ‘Chenggu 32’ among the four cultivars shows a certain self-compatibility, which provide important basis for the selection and configuration of pollination cultivars in the future orchard establishment.

Keywords: olive; cultivar; progeny; paternity analysis; SSR markers