

2011-15-3 等 4 个茶树新品系亲缘关系的 EST-SSR 分析

雷雨, 段继华, 罗意, 黄飞毅, 董丽娟, 李赛君*

(湖南省茶叶研究所, 长沙 410125)

摘要: **目的** 对 2011-15-3 等 4 个茶树新品系进行亲缘关系分析, 以期为新品系的识别、新品种登记及育种亲本选配提供可靠依据。**方法** 利用文献开发的 24 对 EST-SSR 引物, 对 4 个茶树新品系等 7 份材料进行 PCR 扩增, 在所得相似系数的基础上进行 UPGMA 聚类, 并绘制亲缘关系树状聚类图。**结果** 24 对引物共扩增出 69 个等位点, 平均 2.88; 平均杂合度观测值(Ho)、平均杂合度期望值(He)、Shannon 指数的平均值分别为 0.42、0.54、0.75, 相似系数变幅为 0.47~0.89。楮叶齐、碧香早、高芽齐的后代与其母本相似系数值分别高达 0.84、0.79、0.79、0.78。根据相似系数矩阵按 UPGMA 法进行聚类, 在相似系数平均值 0.66 处可将参试的 7 份材料分为 3 类: 第一类为高芽齐和 2011-34-1, 第二类为楮叶齐、2011-21-1 和 2011-21-3, 第三类为碧香早和 2011-15-3。**结论** 明确了 4 个茶树新品系与其他品种的亲缘关系及品种间的遗传距离。

关键词: 新品系; 亲缘关系; EST-SSR

Analysis of genetic relationship of 2011-15-3 and other 3 new strains of tea based on EST-SSR markers

LEI Yu, DUAN Ji-Hua, LUO Yi, HUANG Fei-Yi, DONG Li-Juan, LI Sai-Jun*

(Hunan Tea Research Institute, Changsha 410125, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the genetic relationship of 2011-15-3 and other 3 new strains of tea, so as to offer some information for the new strains identification, new varieties registration and parental selection. **Methods** The 7 tea accessions were analyzed by the 24 pairs of EST SSR primers derived according to references. Based on EST-SSR data, a dendrogram was constructed by UPGMA method. **Results** 69 alleles were amplified totally using 24 EST-SSR primers, on average of 2.88. The observed heterozygosity (Ho), the expected heterozygosity (He) and the Shannon index were 0.42, 0.54 and 0.75 on average, respectively. The similarity coefficient varied from 0.47 to 0.89. The similarity coefficient offspring of Zhuyeqi, Bixiangzao and Gaoyaqi and their female parent were as high as 0.84, 0.79, 0.79 and 0.78, respectively. The 7 materials were classified into 3 groups based on the UPGMA method with the similarity coefficient at 0.66: the first group was Gaoyaqi and 2011-34-1, the second was Zhuyeqi, 2011-21-1 and 2011-21-3, and the third was Bixiangzao and 2011-15-3. **Conclusion** This paper estimated the phylogenetic relationship between 4 new strains of tea and other varieties and revealed the genetic distance among varieties.

基金项目: 湖南省科技厅重大专项资金资助项目(2014FJ1006)

Fund: Supported by Special Major Science and Technology Department of Hunan Province (2014FJ1006)

*通讯作者: 李赛君, 副研究员, 主要研究方向为茶树种质资源与遗传育种研究。E-mail: hnhjhsj@126.com

*Corresponding author: LI Sai-Jun, Associate Professor, Hunan Tea Research Institute, No.702, Yuanda Road, Furong District, Changsha 410125, China. E-mail: hnhjhsj@126.com

KEY WORDS: new strain; genetic relationship; EST-SSR

1 引言

茶树育种工作一直是世界主要产茶国的重点工程,也是各国茶叶产业发展的基础,目前种质利用和新品种选育的主要手段是采用单株选育和人工杂交方法^[1]。楮叶齐是 1957 年从安化云台种中采用单株育种法育成,1987 年被认定为国家级良种(编号 GS13036-1987),制红绿茶品质优良,目前已成为国家级无性系茶树良种中推广面积和影响较大、效益较好的品种之一^[2,3]。碧香早是以福鼎大白茶为母本,云南大叶茶为父本,采用人工杂交育种法育成的省级良种,产量高,红绿茶兼制,在湖南茶区有较大面积栽培,江西、湖北、河南、安徽等省有较大面积引种^[3]。高芽齐(又名楮叶齐 9 号)是从楮叶齐天然杂种后代中选育出的国家级良种(编号 GS13015-1994),红绿茶兼制^[3]。本课题组通过优中选优的系统选种方法,从碧香早、楮叶齐、高芽齐天然杂种后代中选育出 2011-15-3 等 4 个茶树新品系,其均在早期鉴定中表现出较强的生长势优势(见表 1)。

随着分子生物学的发展,分子生物学技术已应用于动植物研究的各个方面。特别是 DNA 分子标记技术已广泛应用于植物遗传育种、高密度遗传图谱的构建、基因定位和克隆、植物亲缘关系鉴别及遗传多样性研究、分子标记辅助选择育种等领域^[4]。DNA 分子标记技术应用于鉴别茶树品种间的亲缘关系已有相关报道^[5-10]。本研究拟采用 EST-SSR 分子标记方法对 2011-15-3 等 4 个茶树新品系进行亲缘关系分析,

明确各品系与其他品种的亲缘关系及品种间的遗传距离,以期为新品系的识别、新品种登记及育种亲本选配提供可靠依据。

2 材料与方法

2.1 材料与设备

2.1.1 实验材料

供试的 7 份材料均于 2014 年 4 月下旬采自于湖南省茶叶研究所种质资源圃,取一芽二叶新梢,用液氮迅速冷冻后于 -80 °C 冰箱中保存,其中 2011-21-1 和 2011-21-3 为楮叶齐天然杂种后代,2011-34-1 为高芽齐天然杂种后代,2011-15-3 为碧香早天然杂种后代,具体见表 2。

2.1.2 仪器与设备

WF2800-D3B 分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); Mastercycler 5322 型 PCR 仪(艾本德生物技术国际贸易有限公司); JY-SCZ7 型电泳仪(北京六一仪器厂); Tannon2500R 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 的提取

采用改进的 SDS 法^[11]提取基因组 DNA。0.7%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量分光光度计测定 DNA 浓度。

2.2.2 引物合成

24 对 SSR 引物参照刘振等^[12]和 Zhao 等^[13]的引物编号和序列,由长沙鼎国生物技术有限公司合成。

表 1 2011-15-3 等 4 个茶树新品系早期性状鉴定一览表

Table 1 The early identification of characters list of 2011-15-3 and other 3 new strains of tea

品种(系)	芽叶颜色		发酵性能	适制性	扦插苗出圃率	茶苗生长势				综合评价
	春	夏				株高	茎粗	叶片数	分枝数	
2011-34-1	绿	黄绿	级	绿茶	60.00%	22.98	2.62	15.94	0.69	中
2011-15-3	黄绿	微紫	级	红茶	80.00%	30.92	3.98	24.33	1.53	优
2011-21-1	黄绿	微紫	级	红绿兼制	68.50%	26.49	3.21	23.10	2.20	良
2011-21-3	黄绿	黄绿	级	绿茶	73.90%	30.80	3.11	19.18	1.53	良
福鼎大白茶	绿	黄绿	级	绿茶	65.00%	25.79	2.93	25.77	3.07	良

表2 供试材料及来源
Table 2 Materials and their origin

编号	品种(系)名称	来源
1	楮叶齐(GS13036-1987)	湖南省茶叶研究所选育的国家级良种
2	高芽齐(GS13015-1994)	湖南省茶叶研究所选育的国家级良种
3	碧香早	湖南省茶叶研究所选育的省级良种
4	2011-21-1	楮叶齐天然杂种中选育出来的新品系
5	2011-21-3	楮叶齐天然杂种中选育出来的新品系
6	2011-34-1	高芽齐天然杂种中选育出来的新品系
7	2011-15-3	碧香早天然杂种中选育出来的新品系

2.2.3 PCR 扩增和产物检测

PCR 扩增体系与扩增程序参照姚明哲等^[14]的方法。反应体系为: ddH₂O 6.65 μL, 10×Buffer 1.0 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 0.7 μL, dNTP(10 mmol/L) 0.2 μL, primers(10 μmol/L)各 0.1 μL, Taq polymerase 0.5 U。扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 再延伸 10 min, 4 °C 保温。扩增产物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶检测, 150 V 电压电泳 240 min, 电泳后参照 Charters 和 Wilkinson^[15]的方法银染显色, 并拍照记录。

2.3 数据处理

利用人工方法读带, 将电泳图上可重复、清晰的条带记为“1”, 同一位置无带或不易分辨的弱带记为“0”, 建立原始数据矩阵。根据软件处理需要, 将 1、0 数据转换为 A、B 等共显数据。计算每对引物扩增位点的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC), $PIC=1-\sum P_i^2$, 式中 P_i 表示第 i 个等位点出现的频率^[16]。

利用软件 Popgen Ver.1.32 对供试群体的哈特-温伯格平衡进行显著性检验, 并计算不同引物的有效位点数、平均杂合度期望值(expected heterozygosity)、平均杂合度观测值(observed heterozygosity)、Shannon 信息指数、Nei 氏期望杂合度^[17]。

采用 NTSYS2.1 软件^[18]计算供试材料间的遗传相似系数, 按 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages)法聚类, 并绘制树状聚类图。

3 结果与分析

3.1 引物扩增的等位点位数及多态性

24 对引物在供试种质资源间共检测到等位点 69 个(表 3), 平均每对引物可检测到 2.88 个, 其中最多的为 5 个(引物 A90), 最少的为 2 个(引物 228、SSR8、A157、A113、1110、663、A58、A55、SSR4), 其扩增的结果见表 2。Ho、He、Nei 的最大值分别为 1.00、0.81、0.76, 最小值分别为 0、0.24、0.24, 平均值分别为 0.42、0.54、0.51; Shannon 信息指数 I 变幅为 0.37~1.22, 平均值为 0.75。以上结果均说明所选用的 24 对 SSR 核心引物在茶树上具有相对较高的多态性。

3.2 新品系与母本相同位点比较

如表 4 所示, 69 个等位点中, 楮叶齐共扩增出 35 个, 2011-21-1 和 2011-21-3 与其相同的位点数分别占其扩增总位点的 88.57%和 85.71%; 高芽齐共扩增出 35 个, 2011-34-1 与其相同的位点数占其扩增总位点的 82.86%; 碧香早扩增出 33 个, 2011-15-3 与其相同的位点数占其扩增总位点的 87.88%。

3.3 供试材料间的亲缘关系

从表 5 可以看出, 供试材料间的相似系数变幅为 0.42~0.89, 平均值为 0.66, 相似系数越大, 表明两者间遗传背景越接近, 相似程度越高, 亲缘关系越近, 反之亦反。2011-21-1 和 2011-21-3 两个新品系的相似系数最大为 0.89, 在聚类图中它们首先聚在一起, 说明两者遗传距离较小, 亲缘关系较近; 碧香早与

表 3 24 对引物在 7 个供试材料中的扩增结果
Table 3 The amplification information of 24 pairs of primer in 7 accessions

引物编号	等位基因数	杂合度观测值 Ho	杂合度期望值 He	Nei 的期望杂合度	Shannon 信息指数 I
234	3	0.43	0.75	0.70	1.10
478	3	0.14	0.46	0.44	0.62
120	3	0.29	0.36	0.28	0.51
699	3	0.00	0.24	0.24	0.38
14	3	0.29	0.36	0.34	0.65
SSR3	3	0.24	0.46	0.44	0.62
166	3	0.00	0.28	0.26	0.48
228	2	0.71	0.59	0.56	0.75
SSR8	2	0.00	0.45	0.43	0.49
SSR1	3	0.00	0.26	0.24	0.61
A211	3	0.31	0.49	0.41	0.37
A157	2	0.39	0.54	0.51	0.70
A113	2	0.18	0.52	0.48	0.57
A90	5	0.71	0.75	0.70	1.22
1110	2	0.86	0.73	0.68	1.08
496	4	0.86	0.77	0.72	1.13
663	2	0.29	0.36	0.34	0.64
A58	2	0.14	0.59	0.56	0.75
A55	2	0.57	0.63	0.59	0.78
142	3	0.71	0.81	0.76	1.19
685	3	1.02	0.64	0.60	0.79
124	4	0.71	0.75	0.70	1.09
1036	4	1.00	0.70	0.66	0.90
SSR4	2	0.25	0.52	0.49	0.46
平均值 Mean	2.88	0.42	0.54	0.51	0.75

表 4 4 个茶树新品系与母本相同的位点
Table 4 The number of common alleles of 2011-15-3 and other 3 new strains of tea and their female parent

品系	与楸叶齐相同的位点数及占其总位点的比例	与高芽齐相同的位点数及占其总位点的比例	与碧香早相同的位点数及占其总位点的比例
2011-21-1	31(88.57%)	/	/
2011-21-3	30(85.71%)	/	/
2011-34-1	/	29(82.866%)	/
2011-15-3	/	/	29(87.88%)

表 5 7 个供试材料的相似系数
Table 5 The similarity coefficient among 7 different accessions

品种(系)	楮叶齐	高芽齐	2011-21-3	2011-21-1	2011-34-1	碧香早	2011-15-3
楮叶齐	1						
高芽齐	0.67	1					
2011-21-3	0.79	0.70	1				
2011-21-1	0.84	0.62	0.89	1			
2011-34-1	0.65	0.78	0.70	0.60	1		
碧香早	0.70	0.58	0.57	0.61	0.47	1	
2011-15-3	0.67	0.59	0.55	0.58	0.51	0.79	1

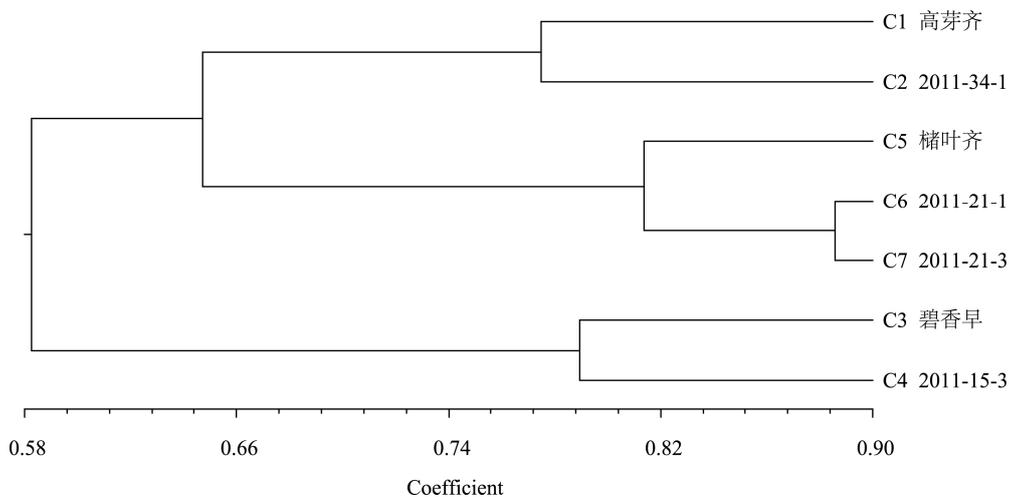


图 1 7 份供试材料的 EST-SSR 数据的 UPGMA 聚类分析树状图

Fig. 1 Dendrogram of 7 accessions tea germplasm on EST-SSR data using UPGMA clustering method

2011-34-1 相似系数最小为 0.47, 表明它们间存在较大的遗传差异, 亲缘关系较远。

新品系与母本的相似系数都比较高。2011-21-1 和 2011-21-3 与其母本楮叶齐的相似系数分别高达 0.84 和 0.79; 2011-34-1 与母本高芽齐的相似系数为 0.78; 2011-15-3 与母本碧香早的相似系数为 0.79。根据相似系数绘制 UPGMA 聚类图, 由图 1 可以进一步说明在相似系数 0.66 处将所参试的 7 份材料分为 3 类: 第 I 类为高芽齐和 2011-34-1, 第 II 类为楮叶齐、2011-21-1 和 2-11-21-3, 第 III 类为碧香早和 2011-15-3。

4 讨论

茶树是异花授粉植物, 其实生后代会出现一定的分离和变异, 这种变异是系统选种的重要原始材料。本课题组于 2009 年冬收集了楮叶齐、碧香早、

高芽齐(楮叶齐 9 号)的天然杂种后代种子, 经播种育苗后进行综合鉴定与选择, 并对当选优良单株进行生长势测定、修剪物称重、发酵性试验、扦插繁殖等早期鉴定, 选择出 2011-15-34 个突出新品系。从本研究结果可以看出, 楮叶齐、碧香早、高芽齐母性遗传能力都很强, 其天然杂种后代与其相似系数值分别高达 0.84、0.79、0.79、0.78。课题组下一步将通过生化成分和制茶品质分析, 期望从品质、产量上选育出超亲新品种。从目前的研究结果来看, 2011-15-3 品质、产量相关性状都有望突破亲本。

参考文献

- [1] 陈亮, 虞富莲, 杨亚军, 等. 茶树种质资源与遗传改良[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006, 12.
Chen L, Yu FL, Yang YJ, et al. Germplasm and genetic improvement of tea plant [M]. Beijing: Science and Technology

- of China Press, 2006, 12.
- [2] 张曙光, 谭正初, 王沅江, 等. 国家级茶树良种楮叶齐的应用与推广[J]. 茶叶通讯, 2008, 35(4): 14–20.
Zhang SG, Tan ZC, Wang YJ, *et al.* Application and extension of national tea improved variety-Zhuyeqi [J]. J Tea Comm, 2008, 35(4): 14–20.
- [3] 杨亚军, 梁月荣. 中国无性系茶树品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
Yang YJ, Liang YR. Chinese clonal tea breeds [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2014.
- [4] 王春侠, 仇敬运. DNA 分子标记技术在遗传育种中的应用[J]. 重庆科技学院学报, 2007, 9(3): 17–19.
Wang CX, Qiu JY. Application of DNA molecular marker in the genetic breeding [J]. J Chongqing Univ Sci Technol, 2007, 9(3): 17–19.
- [5] 刘绍杰. 古蔺牛皮茶种质资源遗传多态性和亲缘关系的 ISSR 和 RAPD 分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
Liu SJ. The ISSR and RAPAD analysis on genetic diversity and phylogenetic relationship of *C. sinensis* cv. Gulin-niupicha germplasm [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2013.
- [6] 席春奕, 唐茜, 吴永胜, 等. 30 份四川茶树种质资源遗传多样性与亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(2): 6–9.
Xi CY, Tang Q, WU YS, *et al.* Genetic diversity and relationship of 30 tea plant germplasms in Sichuan revealed by SRAP marker [J]. Guizhou Agric Sci, 2013, 42(2): 6–9.
- [7] 段云裳, 姜燕华, 王丽鸳, 等. 中国红、绿茶适制品种(系)遗传多样性与亲缘关系的 SSR 分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 99–109.
Duan YS, Jiang YH, Wang LY, *et al.* Analysis of genetic diversity and relationship of tea cultivars and lines suitable for making green and black tea using SSR markers[J]. Sci Agric Sin, 2011, 44(1): 99–109.
- [8] 王旭, 董丽娟, 段继华, 等. 84 个茶树品种遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. 湖南农业大学学报, 2011, 37(3): 260–266.
Wang X, Dong LJ, Duan JH, *et al.* Genetic diversity and relationship of 84 tea cultivars by SSR markers [J]. J Hunan Agric Univ, 2011, 37(3): 260–266.
- [9] 段云裳, 成浩, 姜燕华, 等. 乌龙茶品种(系)遗传多样性与亲缘关系的 SSR 分析[J]. 茶叶科学, 2010, 30(2): 141–148.
Duan YS, Cheng H, Jiang YH, *et al.* Analysis of genetic diversity and relationship of Oolong tea varieties and strains using SSR markers [J]. J Tea Sci, 2010, 30(2): 141–148.
- [10] 余继忠, 黄海涛, 姚明哲, 等. 基于 EST-SSR 的福云(半)同胞系茶树品种(系)遗传多样性和亲缘关系分析[J]. 茶叶科学, 2010, 30(3): 184–190.
Yu JZ, Huang HT, Yao MZ, *et al.* analysis of genetic diversity and relationship of half-sib tea cultivars related to Fuding Dabai and Yunnan Daye using EST-SSR markers [J]. J Tea Sci, 2010, 30(3): 184–190.
- [11] 陈亮, 陈大明, 高其康, 等. 茶树基因 DNA 提取与鉴定[J]. 茶叶科学, 1997, 17(2): 177–181.
Chen L, Chen DM, Gao QK, *et al.* Isolation and appraisal of genomic DNA from tea plant [J]. J Tea Sci, 1997, 17(2): 177–181.
- [12] 刘振, 王新超, 赵丽萍, 等. 基于 EST-SSR 的西南地区茶树资源遗传多样性和亲缘关系分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 100–110.
Liu Z, Wang XC, Zhao LP, *et al.* Genetic diversity and relationship analysis of tea germplasms originated from south western China based on EST-SSR [J]. Mol Plant Breed, 2008, 6(1): 100–110.
- [13] Zhao L P, Liu Z, Chen L, *et al.* Generation and characterization of polymorphic expressed sequence tag-derived polymorphic microsatellites from tea plant (*Camellia sinensis*) and cross-species amplification in its closely related species and varieties [J]. Cons Gene, 2008, 9: 1327–1331.
- [14] 姚明哲, 刘振, 陈亮, 等. 利用 EST-SSR 分析江北茶区茶树资源的遗传多样性和遗传结构[J]. 茶叶科学, 2009, 29(3): 243–250.
Yao MZ, Liu Z, Chen L, *et al.* Genetic diversity and structure of tea germplasm originated from region of North Yangtze river based on EST-SSR markers [J]. J Tea Sci, 2009, 29(3): 243–250.
- [15] Charters YM, Wilkinson MJ. The use of self-pollinated progenies as ‘in-group’ for the genetic characterization of cocoa germplasm [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 160–166.
- [16] Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Human Gene, 1980, 32: 314–331.
- [17] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583–590.
- [18] Rohlf FJ. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.0 [Z]. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc, New York, USA, 2000: 16–29.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



雷 雨, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为茶树种质资源与遗传育种。
E-mail: leiyu0727@163.com



李赛君, 副研究员, 主要研究方向为茶树种质资源与遗传育种。
E-mail: hnhjhsj@126.com

“食品化学与营养”专题征稿函

食品中成分相当复杂, 有些成分是动、植物体内原有的; 有些是在加工过程、储藏期间新产生的; 有些是人为添加的; 有些是原料生产、加工或储藏期间所污染的; 还有的是包装材料带来的。食品营养是指人体从食品中所能获得的满足自身生理需要的必要的生物学过程, 而食品营养学是研究食物、营养与人体生长发育和健康的关系以及提高食品营养价值的措施。食品化学就是从化学的角度和分子水平上研究食品中化学成分的结构、理化性质、营养作用、安全性及可享受性, 以及各种成分在食品生产、食品加工和储藏期间的变化及其对食品营养性、享受性和安全性影响的科学, 为改善食品品质、开发食品新资源、革新食品加工工艺和储运技术、科学调整膳食结构、改进食品包装、加强食品质量与安全控制及提高食品原料加工和综合利用水平奠定理论基础。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品化学与营养”专题, 由西南大学食品科学学院副院长, 西南大学“食品科学与工程”一级学科博士学位授权点、重庆市重点一级学科“食品科学与工程”和重庆市“食品科学与安全优秀教学团队”的带头人, 重庆市营养学会的副理事长, 重庆市营养学会营养与保健食品专业委员会的主任委员, 重庆市食品安全促进会专家委员会主任委员, 重庆市营养师协会副会长, 国家食品药品监督管理局保健食品审评专家 **阚建全 教授** 担任专题主编, 围绕 **食品中的营养成分、微量及添加成分、生理活性成分及以上各成分在食品加工、储藏过程中的次生物质的分离与分析, 食品加工、储藏和运销过程对食品化学成分的影响, 营养与膳食平衡、能量平衡、疾病防治的关系, 食品的营养素强化与功能性食品等方面**或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2015 年 8 月份出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及专题主编 **阚建全 教授** 特邀请您和您的团队为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2015 年 6 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与与支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部