

网络出版时间:2021-05-17 11:29 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.11.010
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20210517.1035.007.html

基于 EST-SSR 标记的陕西茶树种质资源 遗传多样性研究

班秋艳^{1,2}, 潘宇婷¹, 潘 铖¹, 胡 欣³, 李叶云¹, 江昌俊¹

(1 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036; 2 河南农业大学 园艺学院, 河南 郑州 450000;
3 陕西苍山秦茶集团有限公司, 陕西 西安 710002)

[摘 要] **【目的】**明确陕西省茶树种质资源的遗传多样性,为茶树育种提供依据。**【方法】**以陕西地方和野生种质资源、陕西临近省份以及西南茶区共 8 个省份的 118 份茶树资源为材料,利用 43 对高质量 EST-SSR 引物,用 PROSize 2.0 软件统计扩增条带,用 Powermarker V3.25 分析软件计算主等位基因频率(MAF)、基因型、等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、Nei 基因多样性指数(H)和多态信息含量(PIC),用 MEGA 6 软件进行 UPGMA 聚类分析,对陕西茶树资源的遗传多样性进行分析。**【结果】**从 118 份茶树材料中共检测到 310 个等位基因和 832 个基因型。主等位基因频率(MAF)、每个位点等位基因数(N_a)、扩增基因型和多态信息含量(PIC)的平均值分别为 0.336 8, 7.21 个, 19.35 和 0.727 2。Nei 基因多样性指数(H)在 0.232 3~0.911 0, 平均值为 0.760 0;观察到的杂合度(H_o) 在 0.105 7~0.991 8, 平均值为 0.811 2。聚类分析结果将陕西省茶树种质资源分为 3 大类群,同一地区的陕西茶树资源多聚在一起;对不同地区茶树资源的聚类结果表明,陕西省茶树资源聚为一支,且与湖北的茶树资源关系较近。**【结论】**陕西省茶树资源具有丰富的遗传多样性和相对独立的遗传背景,且与湖北省茶树资源遗传关系较近。

[关键词] 茶树育种;分子标记;EST-SSR;遗传多样性;陕西省

[中图分类号] S571.103

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2021)11-0069-10

EST-SSR analysis on genetic diversity of tea germplasm resources in Shaanxi Province

BAN Qiuyan^{1,2}, PAN Yuting¹, PAN Cheng¹, HU Xin³, LI Yeyun¹, JIANG Changjun¹

(1 School of Tea & Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China;

2 College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450000, China;

3 Shaanxi Cangshan Qintea Group Co. Ltd., Xi'an, Shaanxi 710002, China)

Abstract: **【Objective】** This study clarified the genetic diversity of tea germplasm resources in Shaanxi to provide basis for tea breeding. **【Method】** A total of 118 tea germplasm resources from Shaanxi Province, neighboring provinces, and tea planting areas in Southwest China were analyzed using PROSize 2.0, Powermarker V3.25, and MEGA 6. The genetic diversity of tea resources in Shaanxi Province were analyzed by 43 pairs of high-quality EST-SSR primers. PROSize 2.0 was used to count the bands. Major allele frequency (MAF), genotypes, number of alleles (N_a), observed heterozygosity (H_o), Nei's gene diversity index (H) and polymorphism information content (PIC) were calculated by Powermarker V3.25. Nei's genetic distance was calculated by MEGA 6 for UPGMA cluster analysis. The genetic diversity and transmission

[收稿日期] 2020-12-11

[基金项目] 陕西省农业厅、林业厅科技专项“陕西省茶树种质资源普查及古茶树资源调查与保护”(陕农业发[2015]74号)

[作者简介] 班秋艳(1992—),女,河南开封人,讲师,博士,主要从事茶树种质资源与育种研究。E-mail:807071355@qq.com

[通信作者] 江昌俊(1957—),男,安徽岳西人,教授,博士生导师,主要从事茶树种质资源与育种研究。

E-mail:jiangcj@ahau.edu.cn

path of tea resources in Shaanxi Province were analyzed. 【Result】 A total of 310 alleles and 832 genotypes were detected from the 118 tea germplasm resources. The mean values of major allele frequency (MAF), allele per locus, amplified genotype and polymorphism information content (PIC) were 0.336 8, 7.21, 19.35 and 0.727 2, respectively. Nei's genetic diversity index (H) ranged from 0.232 3 to 0.911 0 with an average of 0.760 0. Observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.105 7 to 0.991 8 with an average of 0.811 2. Through genetic analysis, tea germplasm resources in Shaanxi Province can be divided into three groups. Shaanxi tea resources possibly originated from Hubei. The tea resources of Shaanxi Province in the same area were gathered together. The clustering results of tea resources in different regions showed that the tea resources in Shaanxi Province were clustered into one branch, and had a close relationship with those in Hubei Province. 【Conclusion】 Tea resources in Shaanxi Province had rich genetic diversity and relatively independent genetic background. The genetic relationship of tea resources in Shaanxi Province was similar to that in Hubei Province.

Key words: *Camellia sinensis* breeding; molecular markers; EST-SSR; genetic diversity; Shaanxi Province

中国西南地区是茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)的起源中心^[1-2]。茶树作为重要的经济作物,目前在 50 多个国家广泛种植^[3-4]。中国茶树种质资源丰富,具有较高的遗传多样性,在漫长的历史发展过程中,茶树种质资源经自然演化和人工创造形成一种重要的自然资源,蕴藏着各种性状的遗传基因^[1]。茶树遗传多样性是生物多样性的一个重要组成部分,对某些地区濒危物种遗传多样性和结构遗传的研究,将有助于加深对其进化及适应潜力的认识,并有助于最佳保护策略的确定^[5]。

种质资源的科学鉴定和评价是优异资源发掘和利用的前提,国内外学者从形态学、细胞学、生化和分子水平进行了大量研究^[6]。茶树是自交不育、高度异质化的一类作物,利用形态和生理生化特征来描述茶树的表型性状,是农艺性状鉴定的重要依据,这对茶树品种的鉴定具有很高的参考价值。但表型性状易受环境的影响,出现连续性变异或高度的可塑性,不能充分体现品种间和品种内的多态性^[7]。近年来,各种 DNA 分子标记被应用于茶树资源的遗传多样性、鉴定和分类研究^[8-9],如随机扩增多态性 DNA(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、限制性片段长度多态性(RFLP)、简单序列重复(SSR)和启动密码子靶向标记(SCoT)等,为评估茶树资源的遗传多样性和遗传关系提供了很好的信息途径^[10-12]。迄今为止,简单序列重复标记因其共显性遗传、多等位基因性、高基因组丰度、基因组覆盖范围广等特点,在茶树中得到了广泛的应用^[13]。

陕西茶区是我国北方茶区之一,有着悠久的茶叶种植历史。其北屏秦岭、南倚巴山,境内气候终年温和湿润、雨量充沛,长期的自然演化和人工选择造

就了丰富的能适应北亚热带和暖温带生境条件的灌木、中小叶型茶树资源,是我国重要的茶树种质资源基因库^[2]。在 1981—1984 年陕西的茶树资源调查中,程良斌^[14]将陕西省茶树种质资源分为 7 大类。李剑等^[15]利用石蜡制片技术评价陕西茶树品种的抗寒性,观察到其具有叶片较小,栅栏组织层数多、厚度大,栅栏组织与海绵组织比值及上表皮与海绵组织比值较高的特点。Zhang 等^[16]和陈熙^[17]利用分子标记技术分析了陕西秦巴地区的茶叶资源,发现它们具有高度多态性的特点。陕西省茶树栽培品种以地方群体种为主^[14],省级无性茶树品种只有陕茶 1 号。由于陕西茶区地形复杂,交通不便,相比于我国南方茶区,茶树资源的研究不够系统和深入,致使陕西茶树种质资源没有得到充分利用。虽然陕西在茶树种质资源考察、鉴定评价等方面取得了一定的研究进展,但陕西省茶树种质资源在分子水平上的遗传进化关系尚未得到充分研究利用。因此,探索陕西省茶树资源的遗传多样性具有重要意义。

笔者前期调查了陕南茶区汉中、安康两市 10 个地点的 88 种不同形态的茶树资源,并分别从形态和生化成分两方面鉴定了陕西省茶树资源的多样性^[18-19]。然而,形态和生化标记常常受到地理环境的影响,因此本研究利用表达序列标签简单序列重复(EST-SSR)分子标记对陕西省茶树资源的遗传多样性和遗传分化进行分析,以期为江北茶区茶树资源的利用和新品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源及处理

供试茶树资源共 118 份,其中 88 份资源来自陕

西省,30 份资源来自湖北、安徽、湖南、四川、广西、贵州和云南等地,样品详细信息见表 1。新鲜植物叶片采摘后立即用硅胶干燥于-80 ℃下储存。

采用 BIOMIGA 公司植物基因组 DNA 提取试剂盒提取茶树基因组 DNA。采用琼脂糖凝胶电泳(电泳条件:1×TAE 缓冲液;1.2%琼脂糖凝胶;110 V 电压,25 min)检测 DNA 的纯度和完整性;利用核酸定量仪检测 DNA 浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。根据所测的 DNA 浓度,用 ddH₂O 将 DNA 样品稀释到约 50 ng/μL,置于一20 ℃冰箱中保存备用。

表 1 供试茶树材料的名称及原产地信息
Table 1 Name and origins of tested tea resources

种质编号 Germplasm No.	地点 Location	市 City	省 Province
1,2,3,12,14,16,18,19,22,25,27,35,38,40,47,48,59,62,68,76,77,79,80,81,88	紫阳县麻柳镇染房村 Ranfang Village,Maliu Town,Ziyang County	安康 Ankang	陕西 Shaanxi
4,8,9,13,15,20,30,31,37,49,72,87	宁强县青木川镇玉泉坝村 Yuquanba Village,Qingmuchuan Town,Ningqiang County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
5,6,7,10,11,29,32,51,52,53,56,60,71,73,82	紫阳县城关镇青中村 Qingzhong Village,Chengguan Town,Ziyang County	安康 Ankang	陕西 Shaanxi
65	洋县黄金峡镇大沟村 Dagou Village,Huangjinxia Town,Yangxian County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
17,54,66,67,85	城固县董家营镇胥家营村 Xujiaying Village,Dongjiaying Town,Chenggu County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
21,50	城固县二里镇高北村 Gaobei Village,Erli Town,Chenggu County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
23,24,26,28,33,34,39,41,42,43,44,45,46,55,57,61,69,70,84,86	西乡县大河镇石马村 Shima Village,Dahe Town,Xixiang County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
36,64,75	镇巴县兴隆镇水田坝村 Shuitianba Village,Xinglong Town,Zhenba County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
63	镇巴县兴隆镇大河村 Dahe Village,Xinglong Town,Zhenba County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
58,74,78,83	镇巴县兴隆镇青狮村 Qingshi Village,Xinglong Town,Zhenba County	汉中 Hanzhong	陕西 Shaanxi
桂红 1 号 Guihong 1	宛田乡 Wantian Township	桂林 Guilin	广西 Guangxi
桂红 3 号,桂香 18 号 Guihong 3,Guixiang 18	桂林茶叶所 Guilin Institute of Tea Science	桂林 Guilin	广西 Guangxi
石阡苔茶 Shiqiantaicha	石阡县 Shiqian County	铜仁市 Tongren	贵州 Guizhou
黔茶 1 号,苔选 03-10 Qiancha 1,Taixuan 03-10	湄潭县 Meitan County	遵义 Zunyi	贵州 Guizhou
贵定鸟王种 Guidingniaowang	贵定县鸟王村 Niaowang Village,Guiding County	黔南布依族苗族自治州 Buyi and Miao Autonomous Prefecture of Qiannan	贵州 Guizhou
鄂茶 2 号 Echa 2	湖北省咸宁市地区农业科学研究所 Hubei Xianning Institute of Agricultural Sciences	咸宁 Xianning	湖北 Hubei
鄂茶 4 号 Echa 4	湖北省农业科学院果茶蚕桑研究所 Research Institute of Fruit Tea and Sericulture,Hubei Academy of Agricultural Sciences	武汉 Wuhan	湖北 Hubei
鄂茶 7 号 Echa 7	五峰土家族自治县 Wufeng Tujia Autonomous County	宜昌 Yichang	湖北 Hubei
鄂茶 10 号 Echa 10	宣恩县 Xuanen County	恩施土家族苗族自治州 Enshi Tujia and Miao Au- tonomous Prefecture	湖北 Hubei
短节白毫 Duanjie baihao	普文农场和普洱茶树良种场 Yunnan Puwen Farm and Pu'er Tea Seed Farm	西双版纳傣族自治州 Dai Autonomous Prefecture of Xishuangbanna	云南 Yunnan
云抗 10 号 Yunkang 10	勐海县南糯山 Nan Nuo Mountain,Menghai County	西双版纳傣族自治州 Dai Autonomous Prefecture of Xishuangbanna	云南 Yunnan
云瑰 Yungui	思茅茶树良种场 Simao Tea Seed-multiplication Farm	西双版纳傣族自治州 Dai Autonomous Prefecture of Xishuangbanna	云南 Yunnan
云抗 37 号 Yunkang 37	拉祜佤族布朗傣族自治县 Lahu,Wa,Brown and Dai Autonomous County	临沧 Lincang	云南 Yunnan
云抗 27 号 Yunkang 27	云南省农科院茶叶研究所 Tea Research Institute,Yunnan Academy of Agricultur- al Sciences	临沧 Lincang	云南 Yunnan

表 1(续) Continued table 1

种质编号 Germplasm No.	地点 Location	市 City	省 Province
石佛翠 Shifocui	岳西石佛寺茶园 Tea Garden in Shifo Temple, Yuexi County	安庆 Anqing	安徽 Anhui
柿大茶 1 号 Shidacha 1	猴坑村 Monkey Pit Area	黄山 Huangshan	安徽 Anhui
仙寓早 Xianyuzao	祁门县箬坑乡 Ruo Keng Township, Qimen County	黄山 Huangshan	安徽 Anhui
多抗香 Duokangxiang	岳西县 Yuexi County	安庆 Anqing	安徽 Anhui
安徽 3 号 Anhui 3	祁门县 Qimen County	黄山 Huangshan	安徽 Anhui
鳊早 2 号 Fuzao 2	安徽省农科院茶叶研究所 Tea Research Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences	黄山 Huangshan	安徽 Anhui
特早 213, 名山白毫 131 Tezao 213, Mingshanbaihao 131	名山县 Mingshan County	雅安 Ya'an	四川 Sichuan
宜早 1 号 Yizao 1	高县羊田乡华丰村黄桷包组 Yangtian Township, Gao County	宜宾 Yibin	四川 Sichuan
蒙山 9 号 Mengshan 9	名山县蒙山茶场 Mingshan Tea Farm, Mingshan County	雅安 Ya'an	四川 Sichuan
川茶 2 号 Chuancha 2	峨眉山浦兴乡 Puxing Township, Mount Emei	峨眉山 Mount Emei	四川 Sichuan
白毫早 1 号, 楮叶齐 Baihaozao 1, Chuyeqi	安化县 Anhua County	宜阳 Yiyang	湖南 Hu'nan
桃源大叶 Taoyuandaye	桃源县茶树良种站 Taoyuan County Tea Tree Breeding Station	常德 Changde	湖南 Hu'nan

1.2 EST-SSR 标记与 PCR 扩增

用陈熙^[17]、Freeman 等^[20]、姜燕华^[21]公布的 105 对 EST-SSR 引物对茶树材料进行扩增,对其多态性和退火温度进行确定和筛选,从中选取扩增条带清晰、多态性丰富的 43 对引物,引物合成由上海生工生物有限公司完成。参考 Liu 等^[13]的方法,PCR 扩增体系(20 μ L)为:模板 DNA(约 50 ng/ μ L) 2 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ L,dNTPs(10 mmol/L) 0.2 μ L,引物(10 μ mol/L)0.5 μ L,Taq 聚合酶 0.5 μ L,ddH₂O 补足。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 50 s,50~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增的 SSR 片段在 96 通道毛细管电泳全自动核酸分析仪(Fragment AnalyzerTM 96)上进行分离。试剂为双链 DNA 试剂盒 DNF-900(Advanced Analytical Technologies,Inc.),包括 FA-dsDNA 凝胶、5 $\times$ 930 dsDNA 缓冲液、1 $\times$ TE 稀释缓冲液、插层染料、标记物、DNA Marker(分别为 35,75,100,150,200,250,300,400 和 500 bp)、5 $\times$ 毛细管调节液、毛细管储存溶液和矿物油。根据 DNA 浓度,用 1 $\times$ TE 稀释液稀释 PCR 产物约 10 倍。将 2 μ L PCR 产物和 18 μ L 1 $\times$ TE 混合液加入到 96 孔板中,在 96 孔板的 D12 和 H12 位置加入 24 μ L DNA Marker,以分离出 35~500 bp 的扩增片段,辨析不同等位基因之间 1 bp 的差异。将数据进行标准化,并使用 PROSize 2.0 软件校准。选择清晰、亮度高的条带进行后续分析。

1.3 数据分析

根据电泳结果,利用 PROSize 2.0 软件统计目的片段范围内清晰且重复的条带,同时结合人工读带,根据分子质量的大小,从大到小依次记作 A、B、C、D、E……,一条带为纯合,两条带为杂合,分别记录,如 AA、AB、BC、BD、DE、EE 等,不同的引物因等位基因的位置而异,获得原始数据,建立矩阵^[22]。利用 Powermarker V3.25 软件和原始数据,计算物种水平和群体水平的主等位基因频率(major allele frequency,MAF)、基因型(genotype)、等位基因数 N_a (observed number of alleles)、观测杂合度 H_o (observed heterozygosity,)、Nei 基因多样性指数 H (Nei's genetic diversity index,)、多态信息含量 PIC(polymorphic information content)和 Nei's 遗传距离^[23-24]。基于 Nei's 遗传距离,利用 MEGA 6 软件进行 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)聚类,并绘制聚类图^[25]。SSR 多态信息含量的计算公式为:

$$PIC=1-\sum P_i^2。$$

式中: P_i 表示第 i 个等位位点出现的频率。当 $PIC\geq 0.5$ 时,该基因座为高度多态性;0.25 $\leq PIC<0.5$ 时,为中度多态性;当 $PIC<0.25$ 时,为低度多态性。

2 结果与分析

2.1 茶树 EST-SSR 标记的扩增结果及多态性分析
用 43 对 EST-SSR 引物在 118 份茶树材料中共

检测到 310 个等位基因和 832 个基因型。各标记的 MAF 在 0.150 4~0.865 9,平均为 0.336 8。每个位点的等位基因数为 2~14 个,平均为 7.21 个;扩增的基因型为 3~57 个,平均为 19.35 个。43 对 SSR 位点的 PIC 值在 0.205 3~0.904 2,平均为 0.727 2,表明我国茶树具有较高的遗传多样性。这些微卫星位点在所有样品中均有良好的扩增。遗传多样性分析结果表明, H 在 0.232 3~0.911 0,平均为 0.760 0; H_o 在 0.105 7~0.991 8,平均为

0.811 2(表 2)。其中引物 A168 在部分材料中扩增的 EST-SSR 条带见图 1。

利用 Powermarker V3.25 软件对陕西省茶树的 EST-SSR 序列信息进行评价,结果表明,陕西省茶树的 MAF 为 0.348 6,基因型为 17.116 3 个, N_a 为 7.139 5, H_o 为 0.818 2。陕西省茶树具有高度多样性,其 H 值和 PIC 值分别为 0.750 4 和 0.716 7。

表 2 43 对 EST-SSR 引物序列信息及在 118 份茶树材料中的遗传信息
Table 2 Sequence information of 43 EST-SSR primers and genetic information in 118 tea plants

引物 Primer	登录号 Accession No.	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火 温度/℃ Temperature	条带 大小/bp Size range	主等位 基因频率 MAF	基因型 Genotype	等位基 因数 N_a	Nei 基因多 样性指数 H	观测 杂合度 H_o	多态信息 含量 PIC
A9	FE861172	F:TTTATGTAGGGTTCCGTTCC R:GTCGTA CTGCGCTTGTTGG	55	227~271	0.291 0	11	5	0.754 3	0.975 4	0.713 2
A10	FE861214	F:GAGGGAGGTAAGGGACAGT R:TTGTTGACCGAAACGAAGT	55	115~134	0.264 2	34	11	0.841 4	0.829 3	0.823 3
A18	FE942997	F:ACGCTTCTGTTTGGTCTATT R:GATCTTGCTCATCCCTTCAC	55	153~183	0.225 0	25	7	0.835 2	0.850 0	0.813 5
A27		F:TTGCTGGGGTTGTCTATG R:TCAATTGTGGCAATTCT	55	230~267	0.306 7	21	7	0.774 6	0.705 9	0.740 9
A28	EU716314.1	F:AATAAGAATCGGTGACCTCTG R:CTTCATTAACCCCTAAACTAAAC	53	126~151	0.345 5	14	6	0.750 6	0.935 0	0.710 4
A35	CV013957	F:GCGAATGAGAGAGCGAGAAA R:TTTGACTCATCTTCGTAAGGCTC	55	112~128	0.552 8	6	4	0.621 1	0.845 5	0.573 3
A38	EU714122.1	F:CCAAAACCTAGTTTCACTCCA R:ATCAAACGCTCTGTATCGGTG	50	247~278	0.337 4	18	7	0.777 7	0.951 2	0.745 4
A41	EU787433	F:GATTCTGCTGCCATTGTATTCC R:CGCCTCGTCTTCGTCGTTA	62	177~214	0.430 9	11	7	0.713 9	0.869 9	0.670 5
A44	FE861192	F:TGCAACTCGGCCTTCTGT R:GGAGCTGACTTAGCCCTCA	62	193~214	0.608 9	10	5	0.571 1	0.298 4	0.526 6
A47	CV699742	F:TCCCTACAAACCTAACC R:GAGCAGCATCAGAGTCACGT	60	169~207	0.266 1	19	8	0.827 7	0.903 2	0.805 7
A51	AJ621794	F:CTCATGGAGTCCAAGGAAGC R:AAAGCAGTCTGGAACCTTGC	55	161~226	0.216 1	42	14	0.863 3	0.923 7	0.849 0
A54	FE942845	F:TTTTGGTTGCCTCGCCTCC R:TGCTTCCTCTAGGTCCTCC	60	142~170	0.365 9	14	6	0.724 0	0.951 2	0.678 5
A55	CV014485	F:GCTTCTCTCTCCTTCCCC R:CCCCTCCTCTGTGTTGAT	65	108~144	0.343 3	21	7	0.772 4	0.708 3	0.741 1
A43		F:GTGAAGTTAGTTGTTACTCTTTTTG R:AGGGGAAGTGAGGAGGCAT	55	192~223	0.219 5	21	7	0.820 7	0.918 7	0.795 3
A80	CV01400111	F:GCTAATGATAGACCATCTGCTCT R:GGCCATGCTCTCAATAGTAGAACT	62	137~179	0.231 7	23	7	0.822 4	0.926 8	0.798 2
A87	CV013870	F:AGGGGACGGATCTCATATCGT R:GACTTCTCACCGAGTGCTT	60	177~207	0.262 1	18	7	0.818 5	0.951 6	0.793 7
A88	CV013984	F:CAAGTTCACCAACACTATCATTCG R:CGCCACCTAGCAGTCTCTG	59	134~169	0.245 9	18	8	0.846 0	0.991 8	0.827 7
A90	CV014222	F:GGGACACACAAACCTAGTC R:CATCTTTCACAGTTCTCGCAGC	59	93~113	0.431 5	20	8	0.724 8	0.879 0	0.687 3
A96		F:TGGTGGTATCGCTCTTGTATG R:CAGAGTTGGCCCTAATTGGAAA	55	270~305	0.327 9	28	8	0.815 0	0.909 8	0.793 6
A107	FF682745	F:GAGCATCTGGTGGGTTCA R:CAGGCACAAGCCCTACAC	60	155~193	0.360 7	24	9	0.790 9	0.713 1	0.766 3
A114	CV013769	F:TAGCTTTGTGGAGCCTGAG R:ATCTTCCTTCGCTAATCCC	55	187~212	0.344 3	19	8	0.764 0	0.713 1	0.728 4
A117		F:GAATTTGGCGCACGCGA R:TAGCCATTGTGCCACTGTTT	55	169~204	0.245 6	17	7	0.811 1	0.921 1	0.784 0

表 2(续) Continued table 2

引物 Primer	登录号 Accession No.	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火 温度/℃ Tempera- ture	条带 大小/bp Size range	主等位 基因频 率 MAF	基因型 Genotype	等位基 因数 N_a	Nei 基因多 样性指数 H	观测 杂合度 H_o	多态信 息含量 PIC
A120	FE861418	F:AGATTGACATACACACGCACAGA R:CGAAGCAGCCTTGAAATCC	55	133~157	0.463 6	13	6	0.690 4	0.972 7	0.645 5
A121		F:AACCAGAGGCTGAAAAGTCG R:TCGTTGTTGGCTTTCTGACC	65	195~224	0.260 3	19	6	0.808 3	0.826 4	0.780 6
A124		F:CTCCCTCAGAAAACCTA R:CGTTCGATCACTTGCCTC	55	145~165	0.342 7	11	5	0.746 8	0.846 8	0.705 7
A130		F:CAGTTGGTTTCTTCGCCTTCC R:GACCATCATTTAACAGCAGCAT	62	143~156	0.439 4	4	3	0.535 5	0.666 7	0.452 8
A138	FE861636	F:ATTGTCAGCGAGACCACCA R:AGGAAATAACACTATCCCAGATT	55	197~215	0.241 9	19	7	0.809 4	0.814 5	0.781 2
A142		F:ATGCTTCAGGGAGTGACCAT R:ATTTATGCCAAACTACCAACAG	59	249~268	0.365 9	13	5	0.735 0	0.487 8	0.690 5
A156	FE861640.1	F:TGTTACGGTACTTCTTGTTAGC R:AAGTCTTGTGCTTGTGAGGC	59	206~250	0.219 5	22	10	0.851 0	0.983 7	0.833 6
A157	FE942901	F:GGGGTTAGGGTTTGGTCAC R:ATGCCTTAACAAGAACACTACAAG	62	178~204	0.298 4	21	9	0.819 2	0.879 0	0.797 0
A159	CV066952	F:AGTTGGTTTCTTCGCCTTCC R:CCATCATTGAACAGCAGCAT	59	141~146	0.865 9	3	2	0.232 3	0.105 7	0.205 3
A166		F:TTGGCAGATTACCTTGGAGA R:GACCAACAACGGATCACATA	50	251~276	0.379 0	15	6	0.711 5	0.838 7	0.662 6
A168		F:ATGTTGTGGCGGTTCCCT R:AGTGGCAGGTCAGATT	55	241~265	0.399 2	17	9	0.671 8	0.974 3	0.614 9
A180	FE861247.1	F:CAAGACCTCCTTCAGCGA R:AAAAAAGACAAAAGTGACAAT	55	143~163	0.314 5	17	6	0.802 5	0.943 5	0.775 6
A187		F:CCTCTGCTTTGTTTATGCT R:TACCGACAATCACTTGTGGATC	56	148~173	0.369 9	17	6	0.761 8	0.390 2	0.727 0
A211	AJ621786	F:ACTGCTCCTCTTTAGTCCTG R:CTCTTCAAATTCAAATCCCT	55	144~196	0.243 8	32	10	0.853 8	0.966 9	0.837 9
A213		F:GTCATTGATATGGTTTGACAA R:TCACTCCAAAACAACCTACAAA	55	225~305	0.379 0	14	6	0.724 3	0.548 4	0.680 6
Camsin M1	AJ621786	F:GAATCAGGACATTATAGGAATTAA R:GGCCGAATGTTGTCTTTTGT	50	234~298	0.224 1	28	10	0.847 1	0.743 6	0.829 1
Camsin M5	AJ621790	F:AAACTTCAACAACCAGCTCTGGTA R:ATTATAGGATGCAAAACAGGCATGA	60	160~195	0.216 2	36	11	0.850 7	0.909 9	0.833 8
Camsin M8	AJ621793	F:CCATCATTGGCCATTACTACAA R:CCATATGTGTGTGAATGATAAAACC	65	130~160	0.266 1	21	7	0.796 3	0.790 3	0.766 1
Camsin M10	AJ621795	F:TTACATCTCTTTTGCAGCTGTCGG R:CTTCGGGAACCTCTGCTTCATC	65	160~179	0.323 8	10	5	0.738 5	0.975 4	0.690 6
Camsin M11	AJ621796	F:GCATCATTCACCACCTCACC R:GTCATCAAACCAGTGGCTCA	65	141~176	0.150 4	57	14	0.911 0	0.861 8	0.904 2
Camsin M14	AJ621799	F:TGGACTTGGAAGGACTGAGG R:ACAAAGCTCAACCTGCCATT	65	235~304	0.328 6	9	4	0.738 9	0.666 7	0.690 7
平均 Mean					0.336 8	19.35	7.21	0.760 0	0.811 2	0.727 2

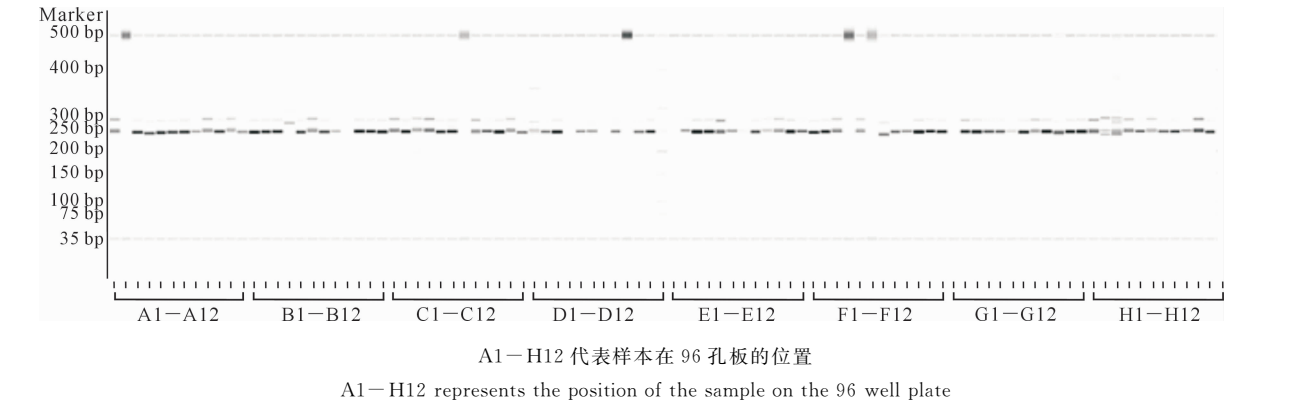


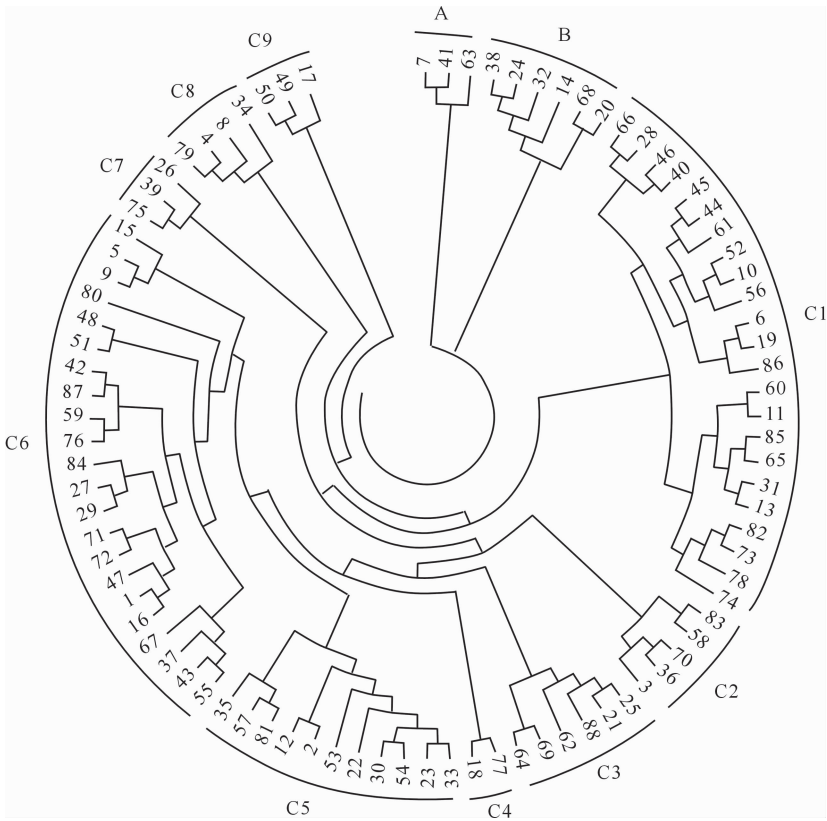
图 1 用 A168 引物从部分茶树材料中分离出的 EST-SSR 条带

Fig.1 Segregation of EST-SSR bands amplified with primers A168 from partial tea materials

2.2 88 份陕西茶树资源的亲缘关系分析

图 2 表明,陕西省 88 份茶树种质资源可分为 A、B、C 共 3 组。其中 A 组包含 3 份茶树资源,分别为紫阳县城关镇青中村的 7 号材料、西乡县大河镇石马村的 41 号材料和镇巴县兴隆镇大河村的 63 号材料。B 组包含 6 份材料,分别为紫阳县麻柳镇染房村的 14、38、68 号材料,西乡县大河镇石马村的 24 号材料,紫阳县城关镇青中村的 32 号材料和宁强县青木川镇玉泉坝村的 20 号材料。C 组类群较大,故根据遗传距离将 C 组分为 9 个亚组(C1—C9),包括除镇巴县兴隆镇大河村外的 9 个地点的 79 份材料。其中 C1 类群包含 23 份材料,7 份来自

紫阳县城关镇青中村的材料聚在一起;C2 类群包含 5 份材料,其中 2 份来自镇巴县兴隆镇青狮村;C3 类群包含 6 份材料,其中 3 份来自紫阳县麻柳镇染房村;C4 类群包含 2 份材料,均来自紫阳县麻柳镇染房村;C5 类群包含 11 份材料,其中 5 份来自紫阳县麻柳镇染房村,3 份来自西乡县大河镇石马村;C6 类群包含 22 份材料,其中 8 份来自紫阳县麻柳镇染房村,5 份来自宁强县青木川镇玉泉坝村,4 份来自紫阳县城关镇青中村,4 份来自西乡县大河镇石马村;C7 类群包含 3 份材料,2 份来自西乡县大河镇石马村;C8 类群包含 4 份材料,2 份来自宁强县青木川镇玉泉坝村;C9 类群包含 3 份材料。



1~88 代表种质编号,且与表 1 相同
1—88 represents the germplasm number,the same as Table 1

图 2 基于 EST-SSR 标记的 88 份陕西茶树资源的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of 88 tea germplasms based on EST-SSR

2.3 8 个省份茶树资源的系统进化分析

根据共有等位基因的遗传距离,对源自 8 个省(自治区)的 118 份茶树资源进行聚类分析。由于陕西省茶树材料数量多,在很大程度上会影响聚类结果,故本研究中陕西省的材料以村庄为单位,其他以省份为单位进行聚类,结果见图 3。聚类结果表明,

当遗传距离为 0.05 时,陕西省的茶树材料聚为一支,说明陕西省茶树群体具有较高的相似遗传信息,为一个相对独立的资源库;所有茶树材料可以分为 6 组,其中湖南、安徽和四川 3 省聚为一组,其余各地各为一组,分别为云南、陕西、湖北、贵州和广西。陕西与湖北两省材料的遗传距离较近。

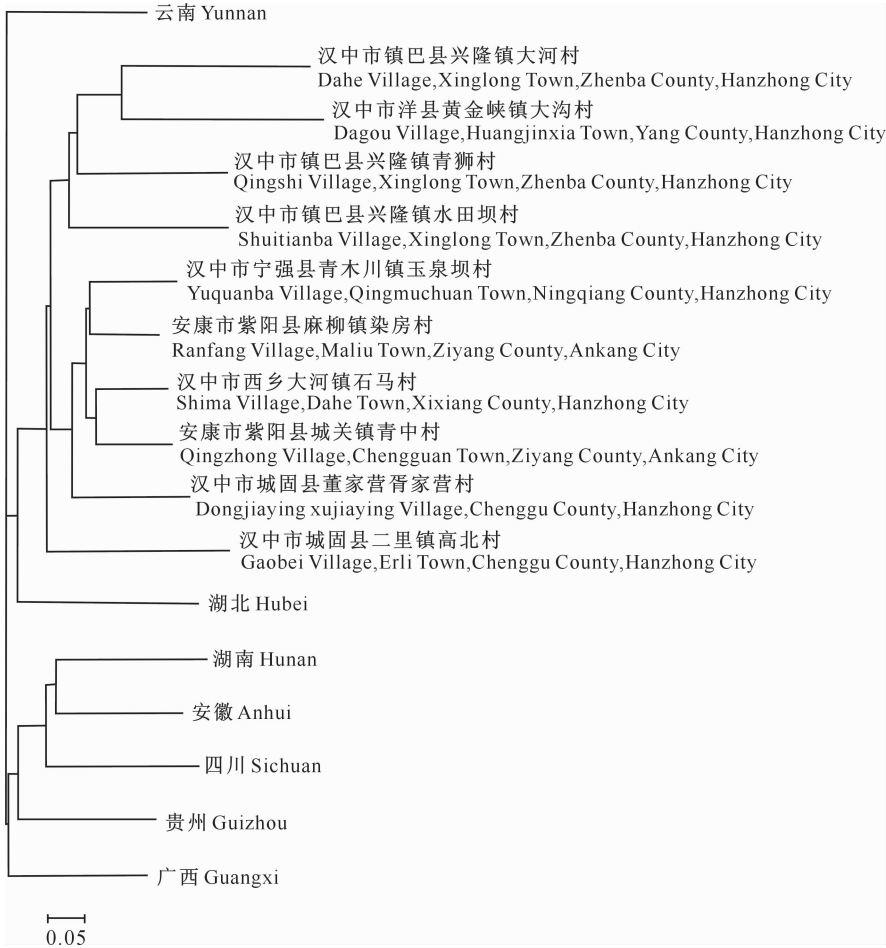


图 3 基于 UPGMA 的 118 份茶树资源聚类图

Fig. 3 Cluster dendrogram of 118 tea resources based on UPGMA method

3 讨 论

3.1 茶树 EST-SSR 的多态性

随着分子生物学、生物信息学、基因组学的快速发展,分子标记的种类也越来越丰富,除了传统的 RAPD、AFLP、RFLP、简单重复序列区间 (ISSR)、EST-SSR 外,近年来又出现了序列标记位点 (STS)、单核苷酸多态性 (SNP)、SCoT 等分子标记。茶树作为异花授粉的多倍体木本植物,基因组相对比较复杂,随着茶树基因组测序的完成^[4,26],基因组 SSR 也逐渐被开发^[13,27]。本研究中 43 对 EST-SSR 引物各项数据均处于理想范围,在 118 份供试茶树材料中具有高度多态性。本研究中茶树材料平均等位基因数(7.21 个)低于 Liu 等^[13]和 Shen 等^[5]报道的基因组 SSR(14.9 个)和 RAPD(9.6 个)。PIC 值(0.727 2)与 Freeman 等^[20]报道的微卫星平均 PIC 值(0.748)相当,低于 Liu 等^[13]报道的 G-SSR 的平均 PIC 值。由于 EST-SSR 较为保守,故比基因组

G-SSR 检测到的多态性低。这与早期的研究结果一致,这些研究表明,在山茶属植物中,基因组 SSR 标记的多态性具有更高水平^[28]。然而,本研究中平均等位基因数高于早期对 EST-SSR 的研究结果^[10,28-29]。这种等位基因数量的差异取决于分离和检测 SSR 片段的方法差异。本研究选择高分辨率的 96 通道毛细管电泳全自动核酸分析仪,以取代琼脂糖和丙烯酰胺凝胶来分析茶树 SSR,这对提高等位基因多态性有显著贡献;同时也降低了试剂成本,提高了灵敏度和效率,更为重要的是,毛细管电泳提高了实验人员的安全保障^[13,17]。目前,毛细管电泳在茶树研究中也得到了一定的应用^[13,17,30]。

3.2 陕西省典型茶树群体的遗传多样性

“陕茶 1 号”是陕西省唯一通过国家品种登记的茶树品种,与陕西丰富的茶树种质资源实际不符,这主要是由于人力和交通的限制,很多资源未能得到很好地挖掘。随着人们对种质资源的认识不断深入,分析手段逐渐更新优化,陕西茶树资源正逐步受

到重视并被加以研究利用。从本研究结果来看,陕西省茶树基因遗传多样性 H 为 0.750 4,高于福建、浙江、台湾等地^[29];也高于 Yao 等^[10] 研究中中国 450 个茶树品种的基因多样性(0.64)。另外,陕西茶树资源的 PIC 值也高于福建、浙江、台湾等省的茶树资源,以及用 61 个 EST-SSR 标记测定的印度茶树资源的 PIC 值(0.497)^[28]。本研究结果为陕西省茶树遗传多样性的评价奠定了理论基础,有利于茶树资源进一步的开发利用。

3.3 陕西省茶树资源的评价

陕西茶树资源的历史可以追溯到唐代。陕西茶树资源位处于江北茶区,远离茶树起源地云贵地区^[18-19]。此前有关陕西茶树资源的研究,仅涉及极少数陕西茶树资源,且使用的 DNA 标记相对较少,对陕西茶树资源的认识不够全面。前期本课题组通过资源调查,并利用表型性状评价,得到不同性状的 88 份茶树资源材料^[18-19]。本研究对以上 88 份陕西茶树资源进行聚类分析显示,同一地区来源的茶树资源多聚类在一起,不同地区的茶树资源也有聚在一起的情况,说明收集的 88 份陕西省茶树资源具有相似的遗传背景,这些资源具有相似的起源或经过了更多的遗传交流。但安康市紫阳县城关镇青中村的 7 号材料与汉中市城固县董家营镇胥家营村的 17 号材料遗传距离较远;且 7 和 17 号材料的茶叶特征性生化成分有较大区别^[19];这 2 个材料遗传背景差异较大,具有较强的育种潜力。地域聚类分析结果表明,安康市茶树资源与汉中市茶树资源是相互传播的。陕西省所有材料聚类在一起,表明陕西省茶树资源拥有相对独立的遗传背景。陕西省和湖北省两地的茶树资源具有比较亲密的遗传关系,在今后的育种工作中,需要加强陕西茶树资源与外省优良茶树资源的基因交流,以创制新的材料。

4 结 论

用 43 对高质量 EST-SSR 标记发现,陕西省茶树资源遗传多样性较高,并具有相对独立的遗传背景。陕西和湖北两地茶树资源的遗传关系较为亲密,茶树育种从业者可以利用遗传关系较远的茶树进行杂交,以获得优良性状的杂交后代。

【参考文献】

[1] 江昌俊. 茶树育种学 [M]. 北京:中国农业出版社,2011.
Jiang C J. Tea breeding [M]. Beijing:China Agricultural Press, 2011.

[2] 江昌俊,胡 歆,纪晓明,等. 陕西茶树地方种质资源图集 [M]. 北京:中国科学出版社,2018.
Jiang C J, Hu X, Ji X M, et al. Atlas of local tea germplasm resources in Shaanxi Province [M]. Beijing:China Science Press, 2018.

[3] Meegahakumbura M K, Wambulwa M C, Li M M, et al. Domestication origin and breeding history of the tea plant (*Camellia sinensis*) in China and India based on nuclear microsatellites and cpDNA sequence data [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2270.

[4] Wei C L, Yang H, Wang S B, et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(18): E4151-E4158.

[5] Shen C W, Huang Y H, Huang J A, et al. RAPD analysis on genetic diversity of typical tea populations in Hunan Province [J]. *Chin J Agric Biotechnol*, 2008, 5(1): 67-72.

[6] 马建强,姚明哲,陈 亮. 茶树种质资源研究进展 [J]. *茶叶科学*, 2015, 35(1): 11-16.
Ma J Q, Yao M Z, Chen L. Research progress of tea germplasm resources [J]. *Tea Science*, 2015, 35(1): 11-16.

[7] Yao M Z, Chen L, Liang Y R. Genetic diversity among tea cultivars from China, Japan and Kenya revealed by ISSR markers and its implication for parental selection in tea breeding programmes [J]. *Plant Breeding*, 2010, 127(2): 166-172.

[8] 谢文钢,李晓松,李 伟,等. 四川地方中小叶茶树资源的表型遗传多样性 [J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(9): 1405-1415.
Xie W G, Li X S, Li W, et al. Phenotypic genetic diversity of *Camellia sinensis* in Sichuan Province [J]. *Zhejiang Agricultural Journal*, 2019, 31(9): 1405-1415.

[9] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种 [J]. *中国农业科学*, 1996(4): 2-11.
Jia J Z. Identification of molecular marker germplasm resources and molecular marker breeding [J]. *Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 1996(4): 2-11.

[10] Yao M Z, Ma C L, Qiao T T, et al. Diversity distribution and population structure of tea germplasms in China revealed by EST-SSR markers [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2011, 8(1): 205-220.

[11] Xu Y X, Shen S Y, Chen W, et al. Analysis of genetic diversity and development of a SCAR Marker for green tea (*Camellia sinensis*) cultivars in Zhejiang Province: the most famous green tea-producing area in China [J]. *Biochemical Genetics*, 2019, 57: 555-570.

[12] Ni S, Yao M, Chen L, et al. Germplasm and breeding research of tea plant based on DNA marker approaches [J]. *Frontiers of Agriculture in China*, 2008, 2(2): 200-207.

[13] Liu S, Liu H, Wu A, et al. Construction of fingerprinting for tea plant (*Camellia sinensis*) accessions using new genomic SSR markers [J]. *Molecular Breeding*, 2017, 37(8): 93.

[14] 程良斌. 陕西省茶树品种资源调查 [J]. *中国茶叶*, 1992, 4

- (6):32-34.
- Cheng L B. Investigation on tea germplasm resources in Shaanxi Province [J]. Chinese Tea, 1992, 4(6):32-34.
- [15] 李 剑, 余有本, 周天山, 等. 陕西茶树品种的抗寒性研究 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(1):262-266.
- Li J, Yu Y B, Zhou T S, et al. Study on cold resistance of tea varieties in Shaanxi [J]. Journal of Northwest Agriculture, 2009, 18(1):262-266.
- [16] Zhang Y, Zhang X, Chen X, et al. Genetic diversity and structure of tea plant in Qinba area in China by three types of molecular markers [J]. Hereditas, 2018, 155:22.
- [17] 陈 熙. 陕西茶树种质资源 DNA 指纹图谱构建 [D]. 陕西汉中: 陕西理工学院, 2016.
- Chen X. Construction of DNA fingerprint of Shaanxi tea germplasm resources [D]. Hanzhong, Shaanxi: Shaanxi Institute of Technology, 2016.
- [18] 班秋艳, 纪晓明, 余有本, 等. 陕西茶树种质资源表型性状的遗传多样性研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(4):575-579.
- Ban Q Y, Ji X M, Yu Y B, et al. Genetic diversity of phenotypic traits of tea germplasm resources in Shaanxi [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2018, 45(4):575-579.
- [19] 班秋艳, 潘宇婷, 胡 歆, 等. 陕西茶树地方种质资源特征性生化成分分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(5):777-782.
- Ban Q Y, Pan Y T, Hu X, et al. Analysis of characteristic biochemical components of Shaanxi tea germplasm resources [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2018, 45(5):777-782.
- [20] Freeman S, West J, James C, et al. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea (*Camellia sinensis*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3):324-326.
- [21] 姜燕华. 我国茶树地方品种遗传多样性及人为选择影响的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- Jiang Y H. Study on genetic diversity and effects of human selection on tea landraces in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [22] 周炎花. 基于叶片形态和 EST-SSR 茶树遗传多样性与遗传演化研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- Zhou Y H. Genetic diversity and genetic evolution of tea plants based on leaf morphology and EST-SSR [D]. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University, 2010.
- [23] Nei M, Tajima F, Tatenos Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. J Mol Evol, 1983, 19:153-170.
- [24] Liu K, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9):2128-2129.
- [25] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8):1596-1599.
- [26] Xia E H, Zhang H B, Sheng J, et al. The tea tree genome provides insights into tea flavor and independent evolution of caffeine biosynthesis [J]. Molecular Plant, 2017(10):866-877.
- [27] Liu S, An Y, Li F, et al. Genome-wide identification of simple sequence repeats and development of polymorphic SSR markers for genetic studies in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Molecular Breeding, 2018, 38(5):59.
- [28] Sharma R K, Bhardwaj P, Negi R, et al. Identification, characterization and utilization of unigenes derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2009, 9:53.
- [29] Fang W, Cheng H, Duan Y, et al. Genetic diversity and relationship of clonal tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China as revealed by SSR markers [J]. Plant Systematics and Evolution, 2011, 298(2):469-483.
- [30] Matsumoto S, Kiriwa Y, Takeda Y. Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104:998-1002.

(上接第 68 页)

- [27] Wang L, Yang L H, Zhang J X, et al. Cloning and characterization of a thaumatin-like protein gene PeTLP in *Populus deltoides* × *P. euramericana* cv. 'Nanlin895' [J]. Acta Physiol Plant, 2013, 35:2985-2998.
- [28] Liu J J, Sturrock R, Ekramoddoullah A K M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function [J]. Plant Cell Rep, 2010, 29:419-436.
- [29] Freitas C D T, Silva M Z R, Bruno-Moreno F, et al. New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity [J]. Plant Physiol Bioch, 2015, 96:45-52.
- [30] Ramos M V, de Oliveira R S B, Pereira H M, et al. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: insights into the mechanism of action [J]. Phytochemistry, 2015, 119:5-18.
- [31] 刘 健. 筱麦病程相关蛋白 Permatin 抗真菌机理的初步分析 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- Liu J. Analyzing of antifungal activity mechanism of Permatin from naked oat (*Avena nuda*) seeds [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2015.
- [32] Yun D J, Zhao Y, Pardo J M, et al. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(13):7082-7087.