

周 萌,李友勇,孙雪梅,等. 基于 EST-SSR 标记的云南野生茶树遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):22-27.

# 基于 EST-SSR 标记的云南野生茶树遗传多样性分析

周 萌<sup>1</sup>,李友勇<sup>1</sup>,孙雪梅<sup>1</sup>,王家金<sup>1</sup>,谢 瑾<sup>1</sup>,成 浩<sup>2</sup>,汪云刚<sup>1</sup>,刘本英<sup>1</sup>

(1. 云南省农业科学院茶叶研究所/云南省茶树种质资源创新与配套栽培技术工程研究中心,云南勐海 666201;

2. 中国农业科学院茶叶研究所,浙江杭州 310008)

**摘要:**通过使用 27 对 EST-SSR 引物对 100 份野生茶树资源和 22 份栽培品种进行了遗传多样性和亲缘关系的分析。结果表明:27 对引物共检测到多态性带 88 条,有效等位基因变异所占比重为 69.01%;基因型 183 个,基因型变幅在 4~11 之间,平均 6.78 个;Shannon 指数在 0.32~1.35 之间,平均 0.88;期望杂合度(0.52)与观测杂合度(0.52)一致;多态杂合率平均为 0.48,接近 0.50;Nei 氏指数平均为 0.51,高于 0.50;多态信息量 PIC 值平均为 0.52,高于 0.50,说明云南野生茶树的遗传多样性丰富。122 份材料聚类为 14 个组。亲缘关系树状图在分子水平上显示了我国云南野生茶树种质资源的亲缘关系,为今后种质资源的保存、开发和研究提供了一定的依据。

**关键词:**茶树;EST-SSR;遗传多样性;亲缘关系

**中图分类号:** S571.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0022-06

茶树是中国重要的经济作物之一,也是云南的重要经济作物。野生茶树为处于自然生长状态下的茶树资源,树龄一般在百年至数百年。野生茶树资源不仅是云南茶树原产地的活化石和见证、国家珍贵财富、人类重要的自然遗产,也是研究茶树起源、演化和品种创新的重要材料<sup>[1]</sup>。在云南众多野生茶树资源中,不乏有优质或性状特异的资源,无疑是品种选育的最佳材料,可用于资源创新。另一方面,随着科学技术的不断进步,一些野生茶树在茶树的分类、演化、育种等方面均具有较高的学术价值<sup>[2]</sup>。EST-SSR 是基于 EST 序列或 cDNA 数据开发的异种分子标记。他来自于功能基因,除具备 SSR 标记的优点外,从 EST 数据库中获得 SSR 建立 EST-SSR 标记经济、且通用性高,还具有引物开发成本低、可直接反映骨干功能基因的多样性等特点<sup>[12]</sup>。由于该技术具有简便、快速、稳定性高和等位基因多样性高等特点,在基因组研究中作为一种主要的分子标记技术已经广泛地应用于遗传图谱的构建、遗传多样性分析和系统学研究<sup>[3]</sup>。本试验通过对国家种质大叶茶树资源圃(勐海)采集的 100 份材料和栽培品种 22 份进行了 EST-SSR 分子标记研究,对这些野生茶树的亲缘关系进行分析,以揭示这些茶树资源间的亲缘关系和遗传多样性,同时有助于今后野生茶树资源的保护、研究和利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

100 份种质资源和 22 份栽培品种(表 1)来自云南省农

业科学院茶叶研究所的国家种质大叶茶树资源圃(勐海)。

### 1.2 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取供试材料的基因组 DNA<sup>[4]</sup>。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,用 NanoDrop ND-1000 分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。根据 DNA 浓度将每份样品用 ddH<sub>2</sub>O 稀释到 20~50 ng/μL,4℃ 保存备用。

### 1.3 SSR 引物

在姜燕华<sup>[5]</sup>使用的引物中选用多态性高、条带清晰的 27 对引物,由上海生工生物工程有限公司合成,编号为:A18、A35、A41、A44、A47、A53、A54、A55、A58、A107、A113、A114、A120、A130、A133、A134、A138、A142、A156、A157、A159、A166、A168、A172、A193、A211、A213。

### 1.4 PCR 扩增和产物检测

参照刘振等<sup>[6]</sup>的反应体系及反应程序,PCR 体系购买宝生物工程(大连)有限公司的产品,反应体系为:Mg<sup>2+</sup> 0.7 μL,10×PCR buffer 1.0 μL,dNTP 0.2 μL,rTaq 酶 0.1 μL,引物 Primer 0.4 μL(F 0.2 μL,R 0.2 μL),模板 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 6.6 μL。PCR 反应在 Bio-Rad DNA Engine Dyad PCR 仪上进行,反应循环为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,不同温度下退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,共 34 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,降温至 4℃ 后转移到 4℃ 冰箱保存。PCR 反应在 Bio-Rad DNA Engine Dyad PRC 仪上进行。

扩增产物加入 2 μL 6×Loading buffer 混匀,Marker (20 bp DNA ladder marker)购买宝生物工程(大连)有限公司的产品,对照范围为 20~500 bp。采用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶在 C. B. S MG V-202-33 型电泳仪(MGV-202-33. C. B. S. SCIENTIFIC. USA)上进行电泳,电压 180 V,时间 70 min。电泳结束后,参照 Wilkinson(2000)的方法进行染色<sup>[5]</sup>,最后使用 FlourChem 型凝胶成像仪(Alpha tnotech corporation, San Leandro, CA, USA)拍照记录。

### 1.5 数据处理

采用人工读带的方法,将电泳图上可重复的、清晰的条带

收稿日期:2013-05-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160175);农业部农作物种质资源保护与利用(编号:NB2012-2130135);云南省科技创新人才计划(编号:2011CI068);国家茶叶现代产业技术体系建设项目(编号:nycytx-23);云南省农业科学院专项(编号:YAAS2012ZY002)。

作者简介:周 萌(1989—),男,云南昆明人,研究实习员,从事茶树资源、品种选育研究。E-mail:g470237458@live.cn。

通信作者:刘本英,博士,研究员。E-mail:liusuntao@126.com。

表 1 122 份供试材料

编号	名称	原产地	保存单位
1	涌宝毛尖茶 <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南云县	国家种质大叶茶树圃(勐海)
2	景新小黄茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>pubilimba</i> Chang	云南墨江	国家种质大叶茶树圃(勐海)
3	帮东大茶树 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南临沧	国家种质大叶茶树圃(勐海)
4	石佛山大茶树 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
5	帕迫大茶树 <i>C. spp.</i>	云南沧源	国家种质大叶茶树圃(勐海)
6	巴达二号 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
7	曼喷龙大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
8	邦外黑茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南陇川	国家种质大叶茶树圃(勐海)
9	新华缅甸大山茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南腾冲	国家种质大叶茶树圃(勐海)
10	狗街小茶 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
11	格 8 号 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	苏联	国家种质大叶茶树圃(勐海)
12	勐养从茶 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	云南梁河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
13	振太野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南镇沅	国家种质大叶茶树圃(勐海)
14	津秀野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南凤庆	国家种质大叶茶树圃(勐海)
15	镇安大树茶(2) <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南龙陵	国家种质大叶茶树圃(勐海)
16	帮崴大树茶 <i>Camellia taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南澜沧	国家种质大叶茶树圃(勐海)
17	潞水宝红茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
18	牛寨高树茶 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	云南盐津	国家种质大叶茶树圃(勐海)
19	水泄大树茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南永平	国家种质大叶茶树圃(勐海)
20	73-6 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
21	河头荒野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南龙陵	国家种质大叶茶树圃(勐海)
22	潞水小茶 <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
23	安定野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南景东	国家种质大叶茶树圃(勐海)
24	羊岔街野茶(1) <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南元江	国家种质大叶茶树圃(勐海)
25	青龙大树茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南大关	国家种质大叶茶树圃(勐海)
26	原房大树茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南红河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
27	达诺茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南楚雄	国家种质大叶茶树圃(勐海)
28	西舍路大树茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南楚雄	国家种质大叶茶树圃(勐海)
29	问帕红芽茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南镇沅	国家种质大叶茶树圃(勐海)
30	威车茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
31	狗街箐茶 <i>Camellia gymnogyna</i> Chang	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
32	景谷大树茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南景谷	国家种质大叶茶树圃(勐海)
33	鲁大村大树茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南楚雄	国家种质大叶茶树圃(勐海)
34	丫口小茶 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
35	勐稳野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南潞西	国家种质大叶茶树圃(勐海)
36	象达大山茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南龙陵	国家种质大叶茶树圃(勐海)
37	大丫口茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
38	牛寨大树茶 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	云南盐津	国家种质大叶茶树圃(勐海)
39	乐昌白毛 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	广东	国家种质大叶茶树圃(勐海)
40	马安大树茶 <i>C. sinensis</i> (L.) O. Kuntze	云南威信	国家种质大叶茶树圃(勐海)
41	小坡头茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南龙陵	国家种质大叶茶树圃(勐海)
42	潞水藤子茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
43	麻旺家茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>pubilimba</i> (Masters) Kitamura	云南双柏	国家种质大叶茶树圃(勐海)
44	上云宝红茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南腾冲	国家种质大叶茶树圃(勐海)
45	荷花村山茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南梁河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
46	河头荒野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南龙陵	国家种质大叶茶树圃(勐海)
47	香竹箐野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南凤庆	国家种质大叶茶树圃(勐海)
48	纳卡大树茶 <i>C. spp.</i>	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
49	兔街茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>pubilimba</i> Chang	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
50	那灯茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>pubilimba</i> Chang	云南麻栗坡	国家种质大叶茶树圃(勐海)
51	元江萼毛茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>pubilimba</i> Chang	云南元江	国家种质大叶茶树圃(勐海)
52	元江野茶(元江老黑茶) <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南元江	国家种质大叶茶树圃(勐海)
53	浪堤茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南红河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
54	羊厓房野茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南楚雄	国家种质大叶茶树圃(勐海)

续表 1

编号	名称	原产地	保存单位
55	闸上大树茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南楚雄	国家种质大叶茶树圃(勐海)
56	竹叶青茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南路西	国家种质大叶茶树圃(勐海)
57	弄岛黑茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南瑞丽	国家种质大叶茶树圃(勐海)
58	昔马茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南陇川	国家种质大叶茶树圃(勐海)
59	弄岛红芽茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南瑞丽	国家种质大叶茶树圃(勐海)
60	邦外绿芽大叶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南陇川	国家种质大叶茶树圃(勐海)
61	田坝绿梗茶 <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南镇沅	国家种质大叶茶树圃(勐海)
62	花拉厂茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>dehungensis</i> sect. <i>laberrima</i> Chang	云南路西	国家种质大叶茶树圃(勐海)
63	底圩白毛茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南广南	国家种质大叶茶树圃(勐海)
64	茶房迟生种 <i>C. tachangensis</i> F. C. Zhang	云南云县	国家种质大叶茶树圃(勐海)
65	龙山大山茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南龙陵	国家种质大叶茶树圃(勐海)
66	大厂大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南梁河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
67	郭大寨大山茶(1) <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南凤庆	国家种质大叶茶树圃(勐海)
68	右甸白芽口茶 <i>C. crassicolumna</i> Chang	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
69	兔街缅甸茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
70	阿伟茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南南涧	国家种质大叶茶树圃(勐海)
71	勐堆大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南镇康	国家种质大叶茶树圃(勐海)
72	牛洪茶 <i>C. multisejala</i> Chang et Tang	云南绿春	国家种质大叶茶树圃(勐海)
73	竹叶青茶(2) <i>C. gymnogyna</i> Chang	云南路西	国家种质大叶茶树圃(勐海)
74	蚂蚁茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南绿春	国家种质大叶茶树圃(勐海)
75	铜厂苦茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南金平	国家种质大叶茶树圃(勐海)
76	云华苦茶 <i>C. sinensis</i> (L. ) O. Kuntze	云南腾冲	国家种质大叶茶树圃(勐海)
77	龙脊茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	广西	国家种质大叶茶树圃(勐海)
78	十八连山大茶 <i>C. tachangensis</i> F. C. Zhang	云南富源	国家种质大叶茶树圃(勐海)
79	黄泥河大茶 <i>C. tachangensis</i> F. C. Zhang	云南富源	国家种质大叶茶树圃(勐海)
80	右甸宝红茶 <i>C. irrawadiensis</i> Chang	云南昌宁	国家种质大叶茶树圃(勐海)
81	兔街白芽口茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
82	单大人茶(1) <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南大理	国家种质大叶茶树圃(勐海)
83	通感茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南大理	国家种质大叶茶树圃(勐海)
84	弄岛野茶(2) <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南瑞丽	国家种质大叶茶树圃(勐海)
85	陇川野茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南陇川	国家种质大叶茶树圃(勐海)
86	龙茶树 <i>C. sinenaia</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
87	瑞丽野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南瑞丽	国家种质大叶茶树圃(勐海)
88	涌宝勐稿茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南云县	国家种质大叶茶树圃(勐海)
89	明朗山大茶树 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南永德	国家种质大叶茶树圃(勐海)
90	大厂大山茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南梁河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
91	干龙潭小叶茶 <i>C. sinensis</i> (L. ) O. Kuntze	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
92	凤山大茶树 <i>C. sinensis</i> (L. ) O. Kuntze	云南路西	国家种质大叶茶树圃(勐海)
93	大梗糯茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南元江	国家种质大叶茶树圃(勐海)
94	忙丙大山茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南镇康	国家种质大叶茶树圃(勐海)
95	猪街软茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南元江	国家种质大叶茶树圃(勐海)
96	梅子箐茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Maters) Kitamun	云南南华	国家种质大叶茶树圃(勐海)
97	鄂加红芽口茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南双柏	国家种质大叶茶树圃(勐海)
98	双柏真茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>publimba</i> Chang	云南双柏	国家种质大叶茶树圃(勐海)
99	大黑山野茶 <i>C. muricatula</i> Chang et Tang	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
100	攸乐野茶 <i>C. taliensis</i> (W. W. Smith) Melchior	云南红河	国家种质大叶茶树圃(勐海)
101	福鼎大白茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Maters) Kitamun	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
102	佛香 1 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Foxiang 1	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
103	佛香 2 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Foxiang 2	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
104	佛香 3 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Foxiang 3	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
105	佛香 4 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Foxiang 4	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
106	佛香 5 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Foxiang 5	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
107	云抗 10 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 10	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
108	云抗 14 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 14	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)

续表 1

编号	名称	原产地	保存单位
109	云抗 43 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 43	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
110	云抗 27 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 27	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
111	云抗 37 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 37	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
112	云抗 48 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 48	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
113	云抗 50 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunkang 50	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
114	云选 9 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunxuang 9	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
115	云茶 1 号 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yuncha 1	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
116	73-8 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. 73-8	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
117	73-11 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. 73-11	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
118	73-38 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. 73-38	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
119	长叶白毫 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Changyebaihao	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
120	云梅 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Yunmei	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
121	阿萨姆 <i>Camellia</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Kitamura	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)
122	紫鹃 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Zijuan	云南勐海	国家种质大叶茶树圃(勐海)

记为“1”,同一位置无带或不易分辨的弱带计为“0”建立原始数据矩阵。使用软件 PowerMarkerV3.25<sup>[7]</sup> 计算每对引物扩增微点的基因型数(number of genotype)、杂合度(heterozygosity)、多态性信息量(PIC)。使用软件 Popgen32 软件计算材料的 Shannon 指数(I)、期望杂合度( $H_e$ )、观测杂合度( $H_o$ ),按非加权类平均法(Unweighted pair group method with arithmetic averaging,UPGMA)进行聚类,绘制聚类图。

2 结果与分析

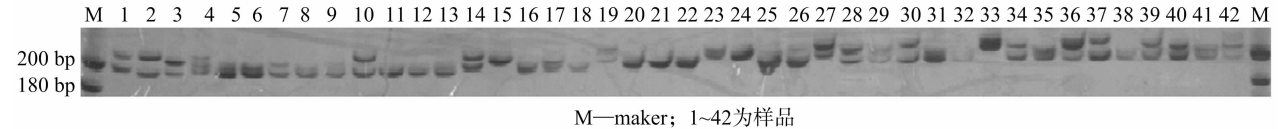
2.1 遗传多样性

从图 1 至图 3 及表 2 可以看出 27 对引物在 122 份参试材料中共扩增出 88 条多态性带,每个位点扩增的等位基因数变幅为 3~4 个,平均 3.26 条;有效等位基因变异所占比重为 69.01%;共检测到 183 个基因型,基因型的变幅在 4(A130)至 11(A54、A58、A156)之间,平均每对引物所扩增的基因型有 6.78 个;27 对引物中 Shannon 信息多样性指数 I 值在 0.32(A168)至 1.35(A58)之间,除 A120(0.49)、A166(0.42)和

A168(0.32)低于 0.50 其他指数均高于 0.50,平均 0.88;观测杂合度在 0.12(A168)至 0.90(A159)之间,平均 0.52,期望杂合度在 0.15(A168)至 0.73(A54、A58)之间,平均 0.52;平均观测杂合度与平均期望杂合度一致;多态杂合率在 0.11(A168)至 0.86(A159)之间,平均 0.48,接近 0.50,说明云南省野生茶树的多态性高;27 对引物的多态性信息量(PIC)值在 0.20(A168)至 0.73(A156),平均 0.52,高于 0.50,说明云南野茶树遗传差异大,具有较高的遗传多样性;Nei 氏指数在 0.14(A168)~0.72(A54)之间,平均 0.51,高于 0.50 说明云南省野生茶资源具有较高的遗传多态性。

2.2 亲缘关系

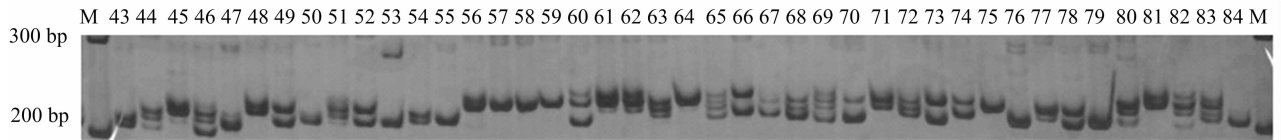
2.2.1 不同材料间亲缘关系 基于 122 份供试材料的 SSR 原始数据,使用 Popgen32 软件计算资源间的遗传距离和遗传一致度,构建资源个体间的聚类树状图,结合 MEGA 软件分析得到图 4。根据计算结果,122 份供试材料的遗传距离在 0.13~0.99 之间,116 号和 118 号遗传距离最小,为 0.13,说明这两份材料在 122 份材料中遗传差异最小;7 号和 38



M—maker; 1~42为样品  
图1 引物 A114 扩增显示的多态性



M—maker; 1~42为样品  
图2 引物 A133 扩增显示的多态性



M—maker; 43~84为样品  
图3 引物 A58 扩增显示的多态性

表 2 122 份茶树资源基于 27 对引物的遗传多样性

引物	等位基因	有效等位基因	基因型	Shannon 指数	观测杂合度	期望杂合度	多态杂合率	多态性指数	Nei 氏指数
A18	3.00	2.36	7.00	0.97	0.57	0.58	0.52	0.59	0.58
A35	3.00	2.14	5.00	0.86	0.83	0.53	0.79	0.50	0.53
A41	4.00	2.16	6.00	0.94	0.69	0.54	0.68	0.50	0.54
A44	4.00	2.27	8.00	0.98	0.55	0.56	0.53	0.53	0.56
A47	3.00	2.16	7.00	0.85	0.53	0.54	0.48	0.54	0.54
A53	3.00	2.94	7.00	1.09	0.83	0.66	0.81	0.61	0.66
A54	4.00	3.60	11.00	1.32	0.70	0.73	0.67	0.70	0.72
A55	3.00	2.85	7.00	1.07	0.35	0.65	0.34	0.60	0.65
A58	4.00	3.71	11.00	1.35	0.69	0.73	0.69	0.69	0.73
A107	3.00	2.82	7.00	1.06	0.68	0.65	0.56	0.68	0.65
A113	3.00	1.71	6.00	0.71	0.33	0.42	0.29	0.49	0.42
A114	3.00	2.27	7.00	0.91	0.63	0.56	0.57	0.55	0.56
A120	3.00	1.33	6.00	0.49	0.24	0.25	0.23	0.31	0.25
A130	3.00	1.85	4.00	0.73	0.66	0.46	0.57	0.53	0.46
A133	3.00	2.10	7.00	0.90	0.43	0.53	0.39	0.56	0.52
A134	3.00	2.36	7.00	0.94	0.44	0.58	0.39	0.59	0.58
A138	3.00	1.48	6.00	0.61	0.29	0.33	0.28	0.34	0.32
A142	3.00	1.58	4.00	0.62	0.47	0.37	0.45	0.36	0.37
A156	4.00	3.35	11.00	1.28	0.53	0.70	0.42	0.73	0.70
A157	3.00	1.80	7.00	0.75	0.17	0.45	0.16	0.45	0.45
A159	3.00	2.65	5.00	1.03	0.90	0.63	0.86	0.59	0.62
A166	3.00	1.25	7.00	0.42	0.16	0.20	0.16	0.24	0.20
A168	3.00	1.17	5.00	0.32	0.12	0.15	0.11	0.20	0.14
A172	4.00	2.27	5.00	1.02	0.77	0.56	0.70	0.59	0.56
A193	3.00	1.97	7.00	0.84	0.48	0.49	0.47	0.47	0.49
A211	3.00	2.94	7.00	1.09	0.43	0.66	0.31	0.70	0.66
A213	4.00	1.66	6.00	0.74	0.47	0.40	0.45	0.42	0.40

号,14 号和 59 号,100 号和 121 号遗传距离最大,为 0.99,说明这几组材料分别在这 122 份材料中的遗传差异较大,15 号和 99 号的遗传相似度最小,为 0.33,说明这两份材料在 122 份材料中差异性较大;116 号和 118 号,102 号和 103 号的遗传相似性系数较大,为 0.88,说明这几组材料分别在 122 份材料中遗传差异较小。

122 份供试材料聚类为 14 组(图 4),第 1 组有 6 份材料,分别为 1、30、53、63、65 和 67 号材料;第 2 组有 21 份材料,分别为 2、4、5、9、10、19、28、36、40、42、44、47、80、86、87、88、90、92、94、95 和 96 号材料;第 3 组有 15 份材料,分别为 3、13、22、24、27、61、69、70、71、72、73、74、81、82 和 89 号材料;第 4 组有 17 份材料,分别为 91、105、107、108、109、110、111、112、113、114、116、117、118、119、120、121 和 122 号材料;第 5 组有 4 份材料,分别为 102、103、104 和 106 号材料;第 6 组有 19 份材料,分别为 6、7、17、20、21、29、31、32、43、45、48、49、62、64、66、83、93 和 98 号材料;第 7 组有 13 份材料,分别为 11、18、25、26、34、39、41、52、76、77、78、79 和 85 号材料;第 8 组有 9 份材料,分别为 8、12、16、46、56、57、58、59 和 60 号材料;第 9 组有 1 份材料,为 15 号材料;第 10 组有 5 份材料,分别为 50、74、84、97 和 115 号材料;第 11 组有 6 份材料,分别为 23、33、35、37、54 和 55 号材料;第 12 组有 3 份材料,分别为 14、38 和 68 号材料;第 13 组有 2 份材料,分别为 100 和 101 号材料;第 14 组有 1 份材料,为 99 号材料。91 号材料(干龙潭小叶茶)

与部分栽培品种聚在第 4 组,115 号材料(云茶 1 号)与部分野生资源聚在第 10 组,大部分栽培品种聚在同一组。第 2 组的两个分支(4、19、28、36、42、47、96 号材料和 9、10、87、88、90、92、94 号材料都来源于保山和楚雄及其附近的地区,聚合在下一大组。第 8 组材料来源地都是在德宏附近,聚在一个组。第 3 组大部分材料来源地是临沧、保山和德宏及其附近,也有几份材料来源地是楚雄,相对其他资源有一定的空间距离,也聚在了一个组。

2.2.2 野生种间的亲缘关系分析 100 份野生资源中大部分资源按照相似的地理来源和遗传背景聚合在不同的组中,也有少量资源如:15 号(镇安大树茶(2))、99 号(大黑山野茶)虽然和一些资源有相近的地理来源,却单独聚在一个组。

2.2.3 栽培品种间的亲缘关系 22 份栽培品种中,大部分材料聚在了下一大组,第 4 组中有 16 份材料,分别为 105、107、108、109、110、111、112、113、114、116、117、118、119、120、121 和 122 号;第 5 组有 4 份材料,分别为 102、103、104 和 106 号,并且第 4 组和第 5 组亲缘关系较近;101 号(福鼎大白茶)和 115 号(云茶 1 号)聚在遗传距离较远的其他组。

3 讨论

本研究中 27 对 SSR 引物被用于 100 份野生茶树资源和 22 份茶树栽培品种的遗传多样性分析,研究结果表明,云南茶树的遗传相似系数在 0.33~0.88 之间,平均 0.61,与刘本

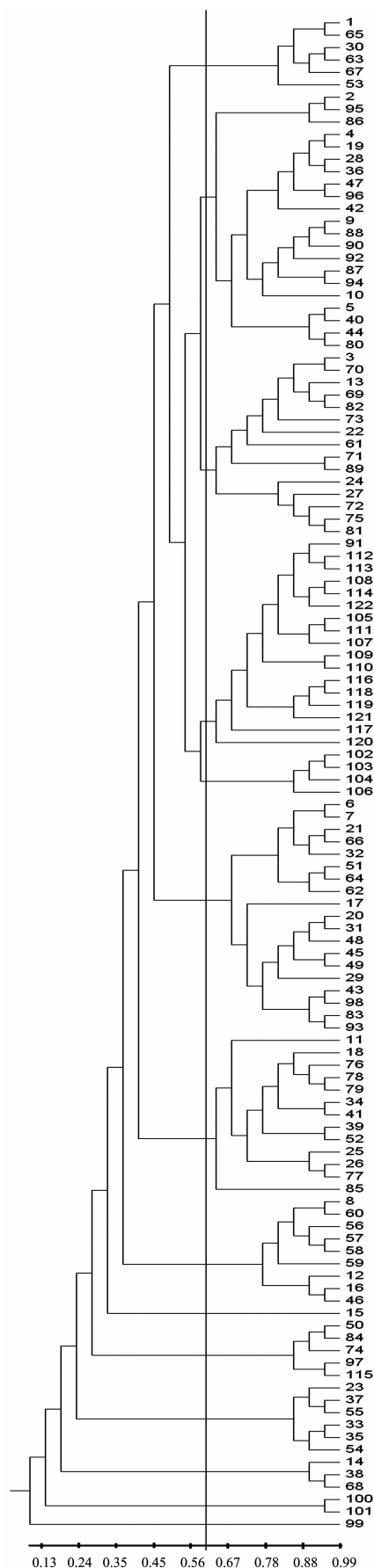


图4 Nei遗传距离基础上的122份茶树材料系统树

英(2008)的研究结果云南大叶种茶种质资源间的遗传相似系数在 0.282 ~ 0.709 之间<sup>[8]</sup>基本一致。印度大吉岭地区 29 个无性系茶树栽培品种的相似系数在 0.68 ~ 0.92 之间<sup>[9]</sup>,我国无性系茶树栽培品种的相似系数在 0.58 至 0.84 之间<sup>[10]</sup>,说明云南茶树的遗传基础较宽。王丽鸳研究结果表明,龙井群体有较高的遗传多样性,多态信息含量 *PIC* 平均为 0.438 2<sup>[11]</sup>,云南野生茶的 *PIC* 平均为 0.52,大于 0.50,说明云南野生茶具有较高的遗传多样性。

本研究聚类结果表明,大部分资源因地理来源相近和遗传背景相似而聚在同一类群。少部分资源,如 91 号(干龙潭小叶茶)和栽培品种聚在同一类群,115 号(云茶 1 号)和几份野生资源聚在同一类群。39 号(乐昌白毛茶)来源地是广东,77 号(龙脊茶)来源地是广西,11 号(格 8 号)的来源地是苏联和 10 份云南野生资源聚在第 7 组。可能是由于不断引种驯化和人工选育,茶树品种资源不断异交而呈现出较近的亲缘关系<sup>[12]</sup>。99 号(大黑山野生茶)可能是由于资源所在地理位置的特殊性和环境的特殊性导致了与外界的某种隔绝,造成了基因得不到广泛交流。

大部分栽培品种按照相似的遗传背景聚在一起。其中 121 号(阿萨姆茶)和本地的一些栽培品种聚在一个组,说明云南的本地栽培种和阿萨姆茶有一定的亲缘关系。

#### 参考文献:

- [1] 孙雪梅,黄 玫,刘本英,等. 云南野生茶树的地理分布及形态多样性[J]. 中国农学通报,2012,28(25):277-288.
- [2] 刘玉芳,林朝赐,秦春玲,等. 浅谈广西茶野生资源的利用与保护[J]. 广西农学报,2011,26(4):100-101.
- [3] 王丽鸳,刘本英,姜艳华,等. 用 SSR 分子标记研究茶组植物种间亲缘进化关系[J]. 茶叶科学,2009,29(5):341-346.
- [4] 刘本英. EST-SSR 和 ISSR 分子标记在云南茶树资源中的应用研究[D]. 杭州:中国农业科学院,2009.
- [5] 姜艳华. 我国茶树地方品种遗传多样性及人为选择影响的研究[D]. 杭州:中国农业科学院茶叶研究所,2010.
- [6] 刘 振,王新超,赵丽萍,等. Genetic diversity and relationship analysis of tea germplasm originated from south western China based on EST-SSR[J]. 分子植物育种,2008,6(1):100-110.
- [7] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2121-2129.
- [8] 刘本英,王丽鸳,周 健,等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(4):458-464.
- [9] Mirshra R K, Sen - Mandi S. Genetic diversity estimates for Dar - jeeling tea clones based on amplified fragment length polymorphism markers[J]. JTea Sci, 2004, 24(2): 86-92.
- [10] 姚明哲,陈 亮,王新超,等. 我国茶树无性系品种遗传多样性和亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 作物学报,2007,33(4):598-604.
- [11] 王丽鸳,姜燕华,段云裳,等. 基于 SSR 分子标记的龙井群体中的遗传多样性及遗传分化研究[J]. 茶叶科学,2011,31(1): 40-44.
- [12] 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.