

茶树 ‘ 黄山种 ’ 自然杂交后代遗传多样性分析

范 凯, 洪永聪, 丁兆堂*, 王 玉

(青岛农业大学茶叶研究所, 山东青岛 266109)

摘 要: 通过 ISSR 标记结合形态学性状, 分析了茶树 ‘ 黄山种 ’ 自然杂交后代的遗传多样性。所调查形态学性状的平均变异系数为 20.5% (12.5% ~ 33.2%), Shannon-weave 指数平均为 1.89 (1.60 ~ 2.07)。22 条 ISSR 引物在供试样品中共扩增出 402 条带, 其中多态性条带 396 条, 多态性比率为 98.5%, 引物的多态性信息指数 (*PIC*) 平均达 0.90, 供试样品的基因多样性 (*H*) 和 Shannon 信息指数 (*I*) 分别为 0.32 和 0.49。充分表明 ‘ 黄山种 ’ 通过自然杂交, 发生了基因的分离和重组, 产生了丰富的遗传变异。Mantel 检测基于形态学与基因型估算的遗传距离矩阵间, 存在极显著正相关 ($r = 0.61$, $P = 0.01$)。基于形态学性状和 ISSR 标记的聚类结果显示, 大多数 ‘ 黄山种 ’ 自然杂交后代的单株可聚成一大类群, 只有少数单株遗传距离较远, 单独聚为一类。这些单株一芽三叶长、百芽质量较大, 可为今后 ‘ 黄山种 ’ 系统选种提供优异种质材料。

关键词: 茶; 形态学性状; ISSR 标记; 遗传多样性

中图分类号: S 571.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 08-1357-06

Analysis of Genetic Diversity Among Natural Hybrid Progenies of *Camellia sinensis* ‘ Huangshanzhong ’

FAN Kai, HONG Yong-cong, DING Zhao-tang*, and WANG Yu

(Tea Research Institute, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Genetic diversity among natural hybrid progenies of *Camellia sinensis* ‘ Huangshanzhong ’ was studied, using some morphological traits and ISSR markers. The average coefficient of variation and Shannon-weave index were 20.5% (ranged between 12.5% and 33.2%) and 1.89 (ranged between 1.60 and 2.07) respectively, based on investigation of morphological traits. Using 22 ISSR primers, 402 discernible DNA fragments were generated, among which 396 (98.5%) were polymorphic. The mean of polymorphism information content (*PIC*) for the ISSR primers was 0.90. The mean of Nei’s genetic diversity (*H*) and Shannon’s information index (*I*) were 0.32 and 0.49 respectively, among all tested individuals. The results showed that genetic variation was high among those progenies of *C. sinensis* ‘ Huangshanzhong ’. The relationship between morphological and ISSR-based distance was significant positively correlated ($r = 0.61$, $P = 0.01$) by Mantel testing. It indicate that ISSR is a useful tool for relationship analysis of tea germplasm resources. Based on morphological and ISSR data, several plants were clustered

收稿日期: 2010-04-27; **修回日期:** 2010-06-30

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (2009ZRB01654); 青岛农业大学引进高层次人才基金项目 (630620)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: dzttea@163.com)

致谢: 本试验在中国农业科学院茶叶研究所国家茶树改良中心完成, 得到陈亮、姚明哲等老师的指导和帮助, 特此致谢!

into a major group, and only few individual plants were divided into single group. These special plants would be of great help to the tea breeding in future.

Key words: tea; *Camellia sinensis*; morphological traits; ISSR markers; genetic diversity

茶树‘黄山种’(*Camellia sinensis* ‘Huangshanzhong’), 属山茶科山茶属茶种, 原产于安徽省歙县黄山一带, 自 20 世纪 60 年代“南茶北引”以来, 山东省曾大量引种, 由于其抗逆性强, 产量高, 目前已成为山东省茶树主栽品种之一。经数十年栽培及在自然环境的驯化, 茶树的形态特征, 生化成分含量以及抗逆性等方面, 发生了一系列变异。王玉等(2009)和洪永聪等(2009)曾通过测定叶片解剖结构、越冬期叶片生理指标等, 研究了‘黄山种’自然杂交后代的抗寒性, 并筛选出了抗寒性较强的种质材料。本研究通过 ISSR 分子标记结合形态学性状, 对‘黄山种’自然杂交后代进行研究, 分析群体品种内的遗传多样性, 从而为茶树的系统选种提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源及其形态学性状调查

2004 年底, 从山东省日照市平家村 1979 年引种种植成园的‘黄山种’茶园中, 采集 20 株长势良好、未受冻害茶树的种子, 于 2005 年春在日照凯越生物科技有限公司茶树种质资源圃中混合播种。按照系统随机取样法, 从 258 株茶树中随机选取 47 株有性单株, 并选取中国农业科学院茶叶研究所国家种质杭州茶树圃内的‘黄山种’作对照。2008 年 10—11 月取当年生枝条中部典型成熟叶片 10 片, 测量从叶片基部至叶尖端部的长度和叶片最宽处的宽度。当春茶第 1 轮侧芽的一芽三叶占全部侧芽数的 50% 时, 从新梢鱼叶叶位处随机采摘一芽三叶, 测量 10 个一芽三叶基部至芽顶点的长度, 并用电子天平称取 100 个新鲜一芽三叶的质量(陈亮等, 2005)。

1.2 ISSR 标记

2009 年春, 取 47 份种质材料的茶树新梢, 液氮速冻后于 -80°C 冰箱保存。提取基因组 DNA(陈亮等, 1997)。用 ND-1000 微量紫外分光光度计(NanoDrop technologies, Wilmington, DE, USA)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。

从 60 个 ISSR 引物中筛选出 22 个扩增条带清晰、稳定的引物对所有的 DNA 样品进行扩增(姚明哲等, 2004)。扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上 120 V 电压, 电泳 150 min。电泳后银染显色, Bio-Rad Gel Doc 2000 凝胶成像仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)拍照记录。

1.3 数据分析

形态学数据的分析: 形态学性状的平均值、标准差等基本统计数据通过分析 SPSS 13.0 进行。形态学性状的遗传多样性指数采用 Shannon-weave 指数, 计算前先对数量性状数据进行标准化处理, 以每个性状级差的 1/10 为间距将各性状分为 10 个等级, 计算公式为: 多样性指数 $= -\sum P_j \ln P_j$, 其中 P_j 为某性状第 j 个代码出现的频率(刘玉皎和宗绪晓, 2008)。用 DPS 3.01 计算欧氏距离, 按类平均法(unweighted pair group with mathematic average, UPGMA)进行聚类分析。

ISSR 标记数据的分析: 利用 Quantity One 软件(Bio-Rad)结合人工方法读带, 将每个样品在电泳图上清晰且可重复出现的条带记为“1”, 同一位置无带和不易分辨的弱带记为“0”, 建立原始矩阵。计算多态性信息指数(polymorphism information content, PIC), $PIC = 1 - \sum p_i^2$, 其中 p_i 为任一引物第 i 对多态性带在所有供试材料中出现的频率(Anderson et al., 1993)。用 POPGENE1.32

计算样品的有效等位基因数 (N_e)，Nei 基因多样性指数 (H) 和 Shannon 信息指数 (I)。用 NTSYS pc 2.1 计算样品的 Jaccard 遗传相似矩阵，按 UPGMA 法建立亲缘关系树状图，并与形态学聚类矩阵进行 Mantel 检测。

2 结果与分析

2.1 ‘黄山种’自然杂交后代形态学性状的变异

对 48 份（含对照株）材料的主要形态学性状进行统计分析（表 1），在所调查的形态学性状中，变异系数平均为 20.5%（12.5% ~ 33.2%），其中一芽三叶百芽质量的变异水平最高（33.2%）；Shannon-weave 指数平均为 1.89（1.60 ~ 2.07），其中一芽三叶长的 Shannon-weave 指数最大（2.07）。

表 1 供试材料形态学性状的变异
Table 1 The variation of morphological traits in tested samples

性状 Trait	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Average	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation	Shannon-weave 指数 Shannon-weave index
叶长/cm Leaf length	3.9	7.2	4.8	0.7	14.6	1.89
叶宽/cm Leaf width	2.0	3.8	2.4	0.3	12.5	1.60
一芽三叶长/cm Length of ' three and a bud '	2.4	6.1	3.7	0.8	21.6	2.07
一芽三叶百芽质量/g Weight of 100' three and a bud '	19.0	62.0	32.5	10.8	33.2	2.01

2.2 ‘黄山种’自然杂交后代 ISSR 扩增产物的多态性

22 条引物在 48 个样品中共扩增出 402 条带，其中 396 条呈多态性，多态性比率为 98.5%；单个 ISSR 引物扩增的条带数在 7 ~ 29 之间，平均 18.3 条（表 2），扩增产物的分子量介于 100 ~ 1 500 bp 之间。引物的多态性信息指数 PIC 平均为 0.90，表明供试材料间具有较高的多态性。48 份供试材料的基因多样性指数 (H) 为 0.32，Shannon 信息指数 (I) 为 0.49。

表 2 供试材料 ISSR 扩增产物的多态性
Table 2 The polymorphism of ISSR PCR bands in tested samples

序号 Code	序列 Sequence	退火温度/ Annealing temperature	扩增条带数 Number of total bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	PIC	序号 Code	序列 Sequence	退火温度/ Annealing temperature	扩增条带数 Number of total bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	PIC
IR6	(AG) ₈ C	57.0	9	9	0.83	IR36	G(AC) ₆	56.5	12	12	0.89
IR12	(CT) ₈ G	57.0	16	16	0.91	IR41	(GT) ₈ T	58.0	13	13	0.90
IR15	(TC) ₈ G	57.5	13	13	0.86	IR43	(GA) ₈ CT	58.0	22	22	0.94
IR16	(AC) ₈ T	55.0	22	22	0.93	IR44	(AC) ₈ TG	56.0	27	27	0.95
IR17	(AC) ₈ G	55.0	21	21	0.93	IR46	(CT) ₈ GG	57.0	14	14	0.85
IR18	(AC) ₈ C	56.0	10	9	0.85	IR47	(AC) ₈ CG	58.5	29	29	0.96
IR19	(CA) ₈ G	56.0	21	21	0.93	IR51	(CAG) ₆ T	66.0	29	27	0.94
IR21	(CA) ₈ A	55.0	18	18	0.91	IR53	(CAA) ₆ G	54.0	23	22	0.95
IR22	(CT) ₈ C	64.5	16	15	0.91	IR56	(CTGA) ₄ G	58.5	22	22	0.93
IR23	(GAA) ₆	50.0	21	21	0.93	IR59	(GGAGA) ₃	55.0	14	14	0.89
IR27	(CAA) ₆	50.0	23	22	0.92	平均	Average	56.1	18.3	18	0.90
IR28	(GATA) ₄	44.0	7	7	0.76						

2.3 ‘黄山种’自然杂交后代遗传多样性的聚类分析

根据形态学性状调查结果，对 48 份供试材料进行聚类分析（图 1），可以看出：在阈值 3.24 处，供试材料大体被分为一个核心群体和 4 个特异单株（HS4、HS24、HS38、HS43）；在阈值 2.15 处，又可将核心群体分为（ 、 、 ）3 个类群。各材料间的遗传距离介于 0.17 ~ 5.41，平均遗传距离 2.49；其中，HS20 和 HS21 的遗传距离最近（0.17），HS1 和 HS24 的遗传距离最远（5.41）。

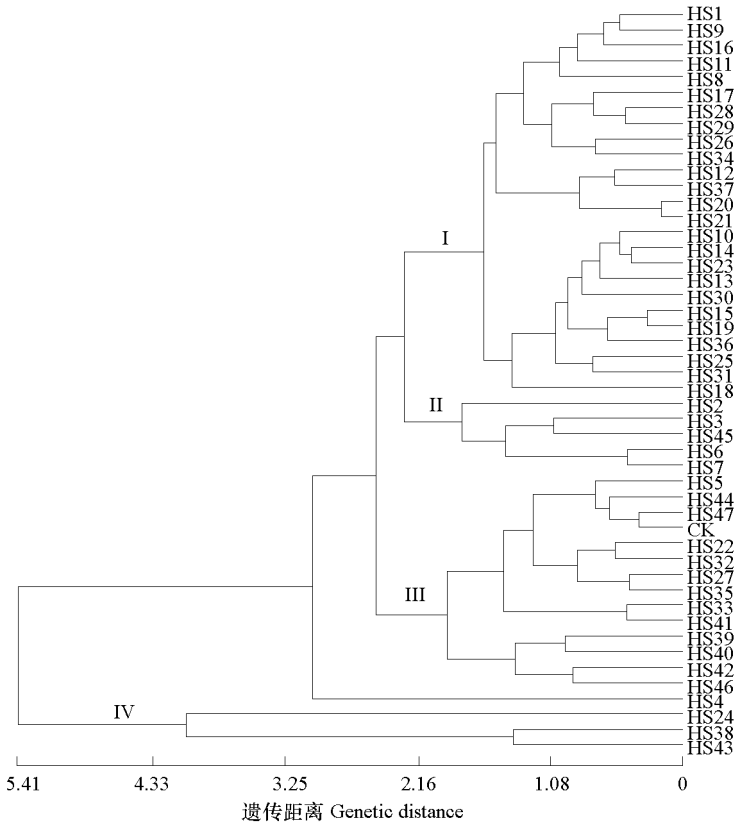


图 1 基于形态学性状的‘黄山种’聚类图

Fig. 1 The dendrogram of ‘Huangshanzhong’ based on morphological data

各类群在主要形态学性状上存在显著差异（表 3）。类群 包括 25 份材料，主要是叶长中等，叶宽中等，一芽三叶长、百芽质量较小的材料。类群 包括 5 份材料，主要是一芽三叶长和百芽质量中等，叶长较大的材料，长度可达 5.7 cm。类群 包括 14 份材料，主要是叶长和叶宽中等，一芽三叶长和百芽质量较大的材料，一芽三叶百芽质量达 42.4 g。类群 包括 4 份材料，其表型性状与大多数种质材料差异较大。

表 3 ‘黄山种’形态学性状类群的比较

Table 3 Comparison of morphological traits clusters of ‘Huangshanzhong’

类群	叶长/cm	叶宽/cm	一芽三叶长/cm	一芽三叶百芽质量/g
Cluster	Leaf length	Leaf width	Length of ‘three and a bud’	Weight of 100 ‘three and a bud’
	4.6 ± 0.4c	2.4 ± 0.2bc	3.1 ± 0.3b	25.7 ± 4.7b
	5.7 ± 0.4b	2.6 ± 0.2b	3.9 ± 0.5a	30.4 ± 6.0b
	4.5 ± 0.3c	2.3 ± 0.1c	4.3 ± 0.6a	42.4 ± 7.6a
	6.6 ± 0.7a	3.2 ± 0.4a	4.5 ± 1.6a	42.3 ± 19.6a

注：不同字母代表在 0.05 水平上存在显著差异（类群间比较）。
Note：Values followed by a different letter are significantly different at 5% level（Compared among clusters）。

基于 ISSR 数据对 48 份供试材料进行聚类分析,构建亲缘关系树状图(图 2),从树状图上分析:在阈值 0.59 处,可将 48 份供试材料划分为两大类群,第 1 类群包括 44 份供试材料(一个核心群体),第 2 类包括 4 份供试材料(HS13、HS18、HS24、HS38),在核心群体中,HS1 和 HS3 又单独聚为 1 类,对照也在核心群体内;各供试样品间的相似系数介于 0.47 ~ 0.78,平均为 0.63,其中 HS28 和 HS29 的相似系数最大(0.78),HS13 和 HS24 的相似系数最小(0.47)。

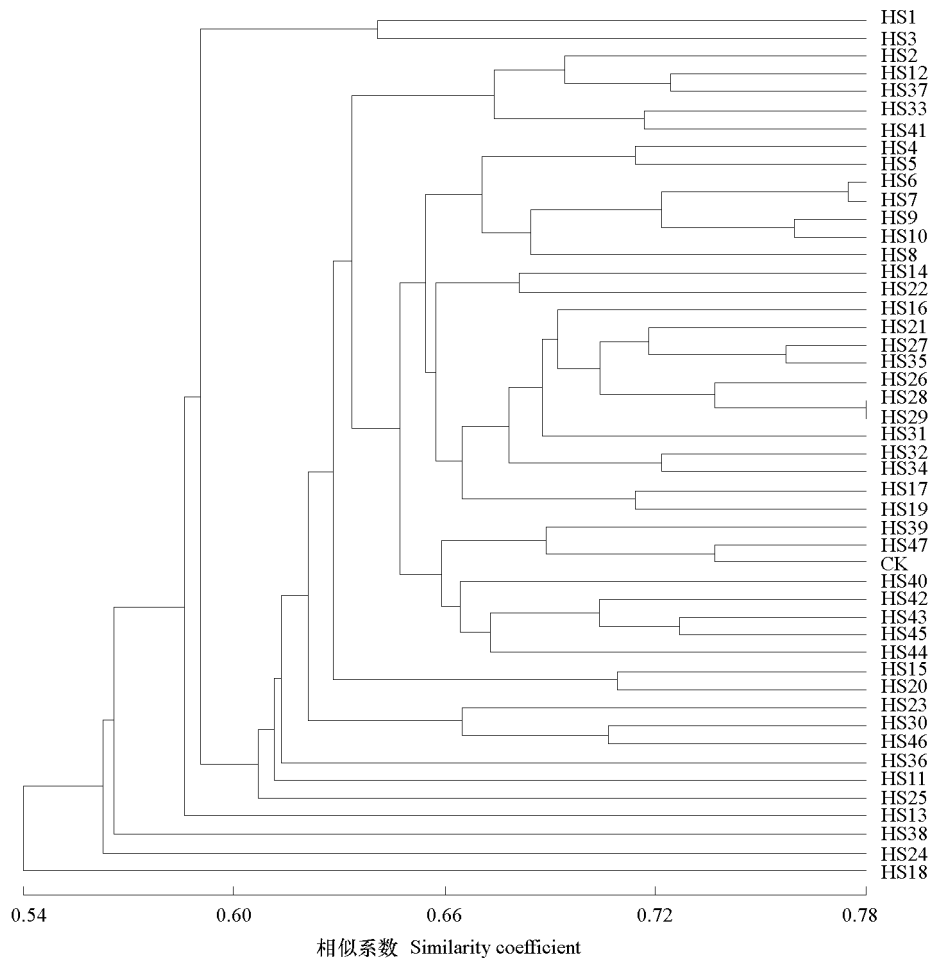


图 2 基于 ISSR 标记的‘黄山种’聚类图

Fig. 2 The dendrogram of ‘Huangshanzhong’ based on ISSR data

通过 Mantel 测验进行表型性状欧氏距离矩阵与 ISSR 遗传距离矩阵之间的相关性分析,结果表明两距离矩阵之间存在极显著正相关关系($r = 0.61$, $P = 0.01$)。

3 讨论

表型多样性是形态学水平上对遗传多样性的阐述,是生物多样性的重要研究内容(李斌和顾万春,2002)。本研究通过对‘黄山种’自然杂交后代形态学水平的多样性分析发现,‘黄山种’种群内各形态学性状均存在一定程度的变异,平均变异系数为 20.5% (12.5% ~ 33.2%), Shannon-weave 指数为 1.89 (1.60 ~ 2.07),表明‘黄山种’自然杂交后代在形态学水平存在较丰富的遗传变异。另外,通过对‘黄山种’遗传多样性的 ISSR 分析,供试样品的基因多样性指数(H)为 0.32, Shannon 信息指数(I)为 0.49,多态性条带的比率达 98.5%。与其它茶树群体品种的遗传多样性水平比较,

总体水平略高于沈程文等(2007)对安化云台山种的研究结果($H = 0.27$, $I = 0.31$),从分子水平上表明‘黄山种’自然杂交后代具有较丰富的遗传变异。本研究结果充分证明‘黄山种’通过自然杂交,发生了基因的重组与分离,产生了丰富的遗传多样性和变异,可以按照不同的变异类型从中筛选出具有不同生物学特性、农艺性状及抗逆性种质材料,为茶树系统选种奠定基础。

对聚类结果具体分析,发现 ISSR 标记与形态学性状并不完全一致。如在 ISSR 标记聚类中聚在一起的 HS9 和 HS10,形态学性状聚类中却距离较远,在形态学性状聚类中聚在一起的 HS6 和 HS7 在 ISSR 分子标记聚类中却距离很远。这可能是由于两种方法所提供的信息量不同及检测位点的不同所造成的。因此,可以在本研究基础上增加一些表型性状的调查如生化成分等,或采用更为精细的标记如 SNP 等,从而为揭示遗传多样性提供更为有力的证据。

对‘黄山种’形态学性状和 ISSR 标记分析表明,‘黄山种’种群具有较丰富的遗传多样性。作为山东省主栽茶树品种,应对其加以充分保护和利用。对于大部分种质材料,可以构建‘黄山种’的核心种质群,有利于种质资源的管理和保存,提高种质资源的利用效率。一些差异较大的种质材料,如 HS13、HS18、HS24、HS38,与其它种质材料的遗传距离相距较远。这些种质材料的一芽三叶长、一芽三叶百芽质量较大,是育种的优良材料,可以对其进行深入研究,从中筛选抗寒性强、高产、优质的单株,进行无性繁殖,从而培育出适合山东省的茶树品种。

References

- Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, Tanksley S D, Sorrells M E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36 (1): 181–186.
- Chen Liang, Chen Da-ming, Gao Qi-kang, Yang Ya-jun, Yu Fu-lian. 1997. Isolation and appraisal of genomic DNA from tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Journal of Tea Science*, 17 (2): 10–23. (in Chinese)
- 陈 亮, 陈大明, 高其康, 杨亚军, 虞富莲. 1997. 茶树基因组 DNA 提纯与鉴定. *茶叶科学*, 17 (2): 10–23.
- Chen Liang, Yang Ya-jun, Yu Fu-lian. 2005. Descriptors and data standard for tea (*Camellia* spp.). Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 陈 亮, 杨亚军, 虞富莲. 2005. 茶树种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社.
- Hong Yong-cong, Wang Yu, Ding Zhao-tang, Zhang Xin-fu. 2009. Cold resistant screening of tea germplasm resources applied by physiological index of leaves in wintering period. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25 (16): 215–218. (in Chinese)
- 洪永聪, 王 玉, 丁兆堂, 张新富. 2009. 越冬期茶树叶片生理指数分析及抗寒种质材料的筛选. *中国农学通报*, 25 (16): 215–218.
- Li Bin, Gu Wan-chun. 2003. Review on genetic diversity in *Pinus*. *Hereditas*, 25 (6): 740–748. (in Chinese)
- 李 斌, 顾万春. 2003. 松属植物遗传多样性研究进展. *遗传*, 25 (6): 740–748.
- Liu Yu-jiao, Zong Xu-xiao. 2008. Morphological diversity analysis of faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm resources from Qinghai. *Journal of Plant Genetic Resources*, 9 (1): 79–83. (in Chinese)
- 刘玉皎, 宗绪晓. 2008. 青海蚕豆种质资源形态多样性分析. *植物遗传资源学报*, 9 (1): 79–83.
- Shen Cheng-wen, Huang Yi-huan, Huang Jian-an, Luo Jun-wu, Liu Chun-lin, Liu De-hua. 2007. RAPD analysis for genetic diversity of typical tea populations in Hunan Province. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15 (5): 855–860. (in Chinese)
- 沈程文, 黄意欢, 黄建安, 罗军武, 刘春林, 刘德华. 2007. 湖南典型茶树地理种群遗传多样性. *农业生物技术学报*, 15 (5): 855–860.
- Wang Yu, Hong Yong-cong, Ding Zhao-tang, Zhang Xin-fu, Wang Yi, Fan Kai. 2009. Cold resistant prediction of tea germplasm resources applied by anatomical structure index of leaves. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25 (9): 126–130. (in Chinese)
- 王 玉, 洪永聪, 丁兆堂, 张新富, 王 漪, 范 凯. 2009. 利用茶树叶片解剖结构指数预测茶树种质材料的抗寒性. *中国农学通报*, 25 (9): 126–130.
- Yao Ming-zhe, Wang Xin-chao, Chen Liang, Yang Ya-jun. 2004. Establishment of ISSR-PCR reaction conditions in tea plant. *Journal of Tea Science*, 24 (3): 172–176. (in Chinese)
- 姚明哲, 王新超, 陈 亮, 杨亚军. 2004. 茶树 ISSR-PCR 反应体系的建立. *茶叶科学*, 24 (3): 172–176.