

SSR 标记鉴定浙江省主要无性系茶树品种的研究

张成才¹, 刘 园¹, 姜燕华², 吴立赞¹, 王丽鸳¹, 韦 康¹, 成 浩¹

(¹中国农业科学院茶叶研究所/国家茶树改良中心/农业部茶树生物学与资源利用重点实验室, 杭州 310008; ²宁海县林业局, 浙江宁海 315600)

摘要:为促进浙江省茶树育种的发展,利用 SSR 引物对浙江省茶树育成品种的遗传多样性进行了研究,筛选出可用于鉴别浙江省茶树品种的核心鉴定引物和标准品种,并进一步应用于未知茶苗身份鉴定。首先,利用 35 对 SSR 引物研究了 36 个茶树育成品种,并进行聚类分析;然后,根据电泳谱带和基因型筛选出核心鉴定引物和标准品种;最后,对 4 株未知茶苗进行了身份鉴定。结果表明:共有 34 对引物表现出多态性,各品种基本按遗传背景聚类,重复样本间遗传距离介于 0~0.094;有 10 对引物确定为核心鉴定引物,8 个品种为标准品种;4 株未知身份茶苗中,NH-01 属于乌牛早品种,另外 3 株并非浙江现有品种。本研究认为,核心鉴定引物在两个浙江育成品种间差异引物对 ≥ 2 时,应判定为不同品种;差异引物对 ≤ 1 时,应判定为相同品种或极相似品种,必要时应引入其余 24 对引物计算遗传距离进一步验证,遗传距离 >0.140 判定为不同品种,遗传距离 ≤ 0.140 判定为同一品种。

关键词:茶树;SSR;品种鉴别;无性系;育种

Application of SSR Markers in Cultivar Identification of Clonal Tea Plant in Zhejiang Province, China

ZHANG Cheng-cai¹, LIU Yuan¹, JIANG Yan-hua², WU Li-yun¹, WANG Li-yuan¹, WEI Kang¹, CHENG Hao¹

(¹ Tea research institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences/National Center for Tea Improvement/Key Laboratory of Tea Biology and Resources Utilization Ministry of Agriculture, Hangzhou 310008; ² Agricultural and Forestry Bureau of Ninghai County, Ninghai Zhejiang 315600)

Abstract: Thirty six tea cultivars originated from Zhejiang province were analyzed using SSR markers. The genetic diversity and cluster analysis shown that: totally 121 alleles and 187 genotypes were amplified by 34 polymorphism markers, with an average of 3.6 and 5.5, respectively; the polymorphism information content (PIC) were ranged from 0.02 to 0.74, with an average of 0.45; most similar cultivars were classified according to their genomic background. Ten core SSR markers fitting for cultivar identification were confirmed, and were used to evaluate 4 unknown varieties. It was believed that if more than 2 core primer pairs were different between 2 tea plants, they should be defined as different varieties, otherwise they were same variety or highly similarity varieties. If necessary, the value of genetic distance should be used to distinguish highly similarity varieties, if the value >0.140 they should be defined as different varieties, otherwise they were same variety. We believed that this study would promote the breeding research of tea plant in Zhejiang province.

Key words: Tea; SSR; cultivar identification; clonal; breeding

茶是重要的经济作物,广泛种植于我国浙江、云南、四川等 20 多个省市和地区^[1]。截至 2010 年底,我国共有国家级审(认)定品种 121 个,省级审(认)定品种 100 余个^[2],优良茶树品种的选育和推广,大

收稿日期:2013-12-16 修回日期:2013-12-27 网络出版日期:2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1021.003.html>

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(No. nyeytx-23);浙江省农业新品种选育重大科技专项(2012C12905)

第一作者研究方向为茶树遗传资源与育种。E-mail: zhangchengcai@tricaas.com

通信作者:成浩,研究方向为茶树遗传资源与育种。E-mail: chenghao@tricaas.com

大地促进了我国茶产业的发展。目前,从茶树科研机构到茶叶生产企业,甚至茶农,都愈加重视新品种的选育。从事茶树种植的茶叶生产者,在无性系茶园中常能发现性状不一致的单株,但由于很多茶园引种不规范,很难确定这些单株是变异株,还是引种时混杂的其他品种。因此,有必要对性状差异单株进行品种特异性鉴定,以确定该单株是可以作为新的育种材料,还是应该剔除出茶园的混杂品种。目前,通常采用现场比对茶树形态学差异的方法进行初步鉴别,但是不同立地条件下同一品种可能会表现出某些性状的差异^[3],不同品种间也可能有某些性状比较相似,该方法很难获得准确的结论。茶树新品种特异性(distinctness)、一致性(uniformity)和稳定性(stability)(简称 DUS)测试能够准确鉴别不同的茶树品种,但需要测试植株、新梢、叶片等 35 个性状^[4],费时费力。因此找到一种操作方便、结果可靠的品种鉴别方法十分迫切。

分子标记技术近年来被广泛应用于植物的种质资源鉴别、遗传多样性研究等相关领域^[5]。在多种分子标记中,简单重复序列(SSR, simple sequence repeat)标记,又称微卫星(microsatellite),具有重复性好、多态性高、共显性、易于检测、鉴别能力高和不受环境条件影响等优点,是一种行之有效,而且最接近理想化的品种鉴别方法^[6-7],在玉米^[6,8-9]、小麦^[10-11]、棉花^[12]、大豆^[13]、水稻^[14]、苹果^[15]等作物的指纹图谱构建、种子纯度检测、品种鉴别和未知种身份识别中均有应用。赵久然等^[6]使用 60 个玉米自交系筛选了 158 个 SSR 引物,最终筛选出 10 个核心引物,同时指出核心引物将推动 SSR 技术在玉米种质鉴定上的普及。李育强等^[12]使用 331 对 SSR 引物分析了湘杂棉系列品种和部分亲本,挑选出 19 对引物构建了湘杂棉指纹图谱,并进行了种子纯度检测和未知种身份识别,为湘杂棉品种注册和知识产权保护提供了参考。在茶树中,杨阳等^[16]使用 17 个 SSR 标记构建了湖南省主要茶树品种的分子指纹图谱,并赋予每个参试品种一个 17 位数的号码,实现彼此区分;刘本英等^[17]使用简单序列重复区间(ISSR, inter simple sequence repeat)标记构建了 20 个云南无性系茶树良种的指纹图谱,为每个品种的鉴别提供了依据。浙江省拥有 14 个国家审(认)定的品种,20 余个省审(认)定的品种^[18],实现每个品种的准确鉴别,有助于促进浙江省茶树育种的发展。本研究利用 35 对 SSR 引物分析了浙江省 36 个茶树品种,筛选出可用于品种鉴别的核心引物,拟为

茶树育种材料的早期鉴定提供依据,促进浙江省茶树育种研究的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验共使用 45 份茶树材料(表 1),包括浙江省审定品种 36 个,均取自国家茶树种质资源圃,对浙农 113、浙农 12、龙井 43、乌牛早和苹云 5 个品种设置重复,分别从种植于 2 个不同地点的茶树上单独采样;4 株待鉴定茶苗由宁海县林业局提供。采 1 芽 2 叶新梢,液氮冷冻, - 70℃ 保存备用。

表 1 供试茶树材料名称和原产地信息
Table 1 Name and origin of evaluated samples

编号	名称	原产地	编号	名称	原产地
Code	Name	Origin	Code	Name	Origin
1	水古茶	临海	24	青峰	杭州
2	乌牛早	永嘉	25	中茶 108	杭州
3	苹云 A	平阳	26	中茶 302	杭州
4	浙农 121	杭州	27	浙农 139	杭州
5	藤茶	临海	28	茂绿	杭州
6	浙农 21	杭州	29	浙农 113 B	杭州
7	浙农 25	杭州	30	银猴茶	遂昌
8	黄叶早	温州	31	苹云 B	平阳
9	瑞安清明早	瑞安	32	浙农 12 B	杭州
10	苔香紫	杭州	33	洛舍	湖州
11	眉峰	杭州	34	报福 1 号	湖州
12	霜峰	杭州	35	翠峰	杭州
13	安吉白茶	安吉	36	瑞安白毛茶	瑞安
14	平阳特早	平阳	37	中茶 102	杭州
15	龙井 43 A	杭州	38	横山早	湖州
16	迎霜	杭州	39	龙井 43 B	杭州
17	劲峰	杭州	40	乌牛早 B	永嘉
18	碧云	杭州	41	浙农 117	杭州
19	浙农 12 A	杭州	42	NH - 01	宁海
20	菊花春	杭州	43	NH - 02	宁海
21	寒绿	杭州	44	NH - 03	宁海
22	龙井长叶	杭州	45	NH - 04	宁海
23	浙农 113 A	杭州			

1 ~ 41 为选育品种,42 ~ 45 为待鉴定材料
1-41 were varieties bred,42-45 were materials to be identified

使用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[19],使用 ND-1000 UV-Vis 分光光度计(Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)检测 DNA 浓度,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。将 DNA 原液稀释到 20 ng/μL, - 20℃ 保存备用。

1.2 PCR 扩增和电泳检测

使用 10 μL 的体系进行 PCR 反应,包括上下游引物各 0.2 μL , 10 $\times$ Buffer (Mg^{2+}) 1 μL , dNTP 0.2 μL , *Taq* 酶 0.5 U,加 ddH_2O 至 10 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶在 C. B. S MG V-210-33 型电泳仪 (C. B. S Scientific Company, USA) 上电泳检测,电压 170 V,时间 120 min。然后银染显色^[20],使用 Flurochem 型凝胶成像仪 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 拍照记录。

1.3 数据处理

采用人工读带的方法,判读电泳图上的条带,将不同的条带由大到小按照 A、B、C、D、E 等依次赋值,缺失条带以“-”表示,统计每份供试材料的基因型。使用 Popgene 软件 (<http://cc.oulu.fi/~jaspipopgen/popgen/popgen.htm>) 计算每对引物的等位位点数 (N_a , number of alleles)、基因型数 (genotypes)、观测杂合度 (H_o , observed heterozygosity)、期望杂合度 (H_e , expected heterozygosity)、等位基因频率 (allele frequency) 和遗传距离 (genetic distance),按 UPGMA 的方法绘制聚类图,并计算每个样本间遗传距离,根据 $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n X_i^2$ 计算标记的多态性信息含量 (PIC)。 PIC 值是一个衡量位点多态性的重要指标, $PIC < 0.25$ 时位点表现为低度多态性,当 $0.25 <$

$PIC < 0.5$ 时为中度多态性, $PIC > 0.5$ 为高度多态性^[21]。

1.4 核心鉴定引物和标准品种的确定

根据电泳图谱和标记的多态性分析结果,选择重复性好、易于读带、 PIC 值高并且能有效区分浙江省茶树育成品种的引物,作为核心鉴定引物。对核心鉴定引物在不同品种中的带型进行统计和分析,筛选出包含所有等位位点的最少品种组合,作为品种鉴定的标准品种。

1.5 未知茶苗身份鉴定

比对未知身份茶苗与现有品种的差异标记,并结合聚类图和遗传距离判断未知茶苗是否属于浙江省现有茶树品种。

2 结果与分析

2.1 浙江省茶树审定品种遗传多样性分析

在 35 对参试引物中,34 对引物表现出多态性,扩增效果见图 1。这些多态性引物,扩增到的等位位点数介于 2~6,平均为 3.6;基因型数为 2~12,平均为 5.5;观测杂合度和期望杂合度分别介于 0.03~0.85 (平均 0.46) 和 0.03~0.75 (平均 0.45)。多态性信息含量在 0.02~0.74 之间,平均为 0.45,包括 6 个低度多态性标记、11 个中度多态性标记和 17 个高度多态性标记 (表 2)。

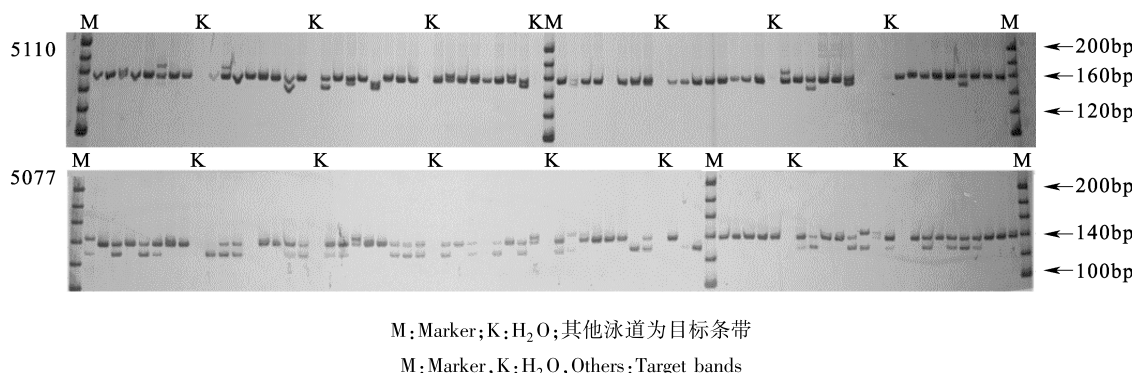


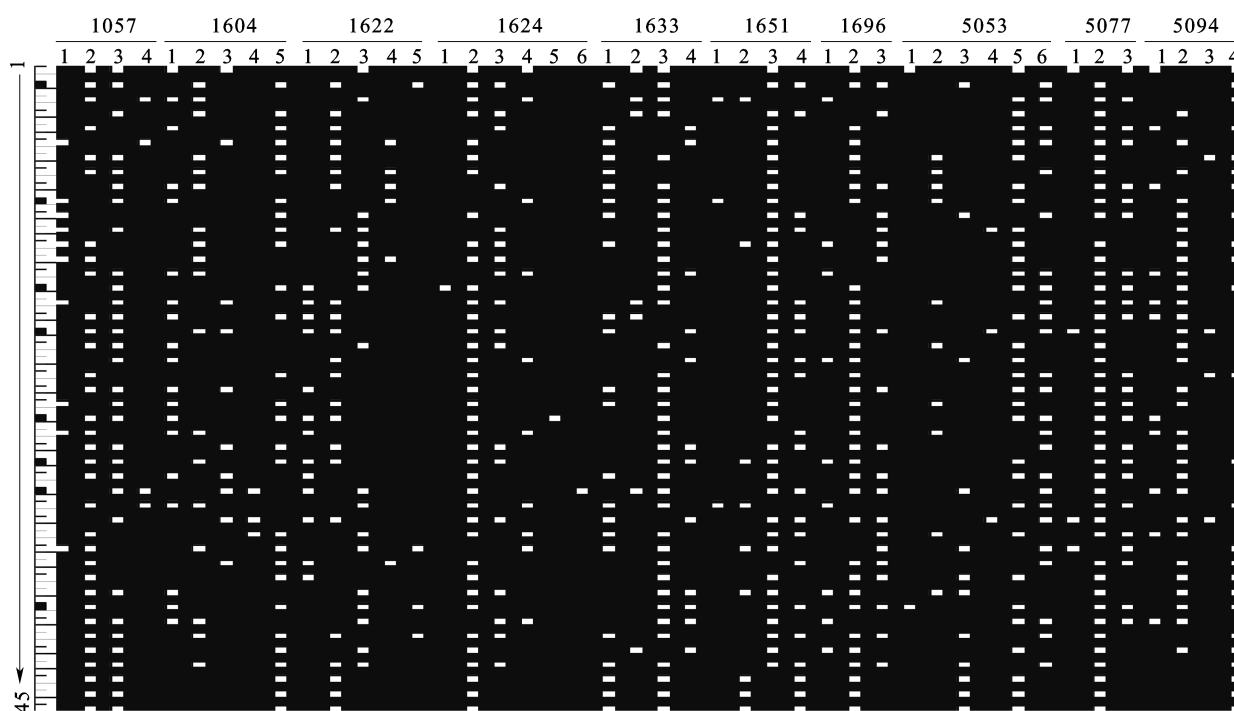
图 1 引物 5110 和 5077 的谱带

Fig. 1 The SSR fingerprint of tested samples using primer 5110 and 5007

2.2 参试品种的聚类分析

图 2 是基于 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 聚类图,各品种基本按照遗传背景聚类,在小类群中则按照选育单位聚类。比如,属于福云 (半) 同胞系^[22]的中茶 302、劲峰、银猴茶,以及浙农 121、浙农 12、浙农 21 等品种聚在了一起。由浙江大学茶学系育成的浙农 12、浙农 121 和浙农 139,以及由中国农

业科学院茶叶研究所育成的中茶 102 和菊花春等,分别聚为不同的小类群;格鲁吉亚 8 号有性后代选育的寒绿和贵州的湄潭苔茶有性后代选育的苔香紫,与其他品种遗传距离最远;而从自然生长的群体种中经单株选育出的龙井 43、龙井长叶、中茶 102 等品种则分散分布于聚类图中。5 个设置重复的品种,分别同自身重复样本聚在一起,重复样本间的遗



编号 1~45 表示不同茶树品种编号,同表 2;品种编号右侧的 8 个黑色方格标示的是标准品种位置

The number from 1 to 45 is the same indicated in table 2, the black squares beside the number indicated the location of standard varieties

图 3 核心鉴定引物在参试品种中的模式图谱

Fig. 3 The fingerprint of tea varieties constructed by 10 core primer pairs

2.4 未知茶苗的遗传分析

统计 10 对核心鉴定引物在 4 株未知茶苗中的带型,比较其与审定品种间的带型差异。结果表明, NH-01 与乌牛早的带型最接近,仅有 1 对引物带型存在差异(图 2, 引物 1622); NH-02、NH-03 和 NH-04 之间带型完全一致,但与其他品种带型差异较大。结合供试材料的聚类图和遗传距离进行分析,4 株茶苗与乌牛早遗传距离最近(图 1),其中 NH-01 与乌牛早间的遗传距离为 0.107,其他 3 株茶苗与乌牛早的遗传距离为 0.220。

3 讨论

DNA 分子指纹检测技术能够实现植物新品种的快速鉴别^[4,9]。我国目前仅有少数作物,如水稻^[23-24]和玉米^[25]等颁布了 DNA 指纹检测技术标准。水稻品种鉴定 DNA 指纹方法,推荐了 24 对基本核心引物,并指出品种间差异引物对 ≥ 2 ,判定为不同品种;差异引物对 = 1,判定为近似品种;差异引物对 = 0,判定为相同品种或极近似品种^[23]。

在鉴定过程中,当两个品种被判定为近似品种时,通常有必要使用遗传距离或遗传相似度等参数进一步加以区分^[25-26]。目前,在不同作物中有多个

划分品种特异性的遗传距离临界值,如 0.05^[25]、0.10^[26-28]、0.25^[29]等,但每一个标准都不能适用于所有作物^[26]。本研究,各重复样本间遗传距离介于 0~0.094 之间,不同品种间遗传距离最近的是浙农 139 和浙农 121,为 0.149,由此认为将浙江省茶树品种特异性遗传距离临界值设为 0.140 比较稳妥。因此,根据本研究结果并综合以上标准,认为当 2 个浙江茶树品种间差异引物对 ≥ 2 ,应判定为不同品种;差异引物对 ≤ 1 时,判定为相同品种或极相似品种,必要时引入其余 24 对引物计算遗传距离进行判别,遗传距离 > 0.140 为不同品种,遗传距离 ≤ 0.140 为同一品种。

在使用 SSR 进行不同品种鉴别时,理论上出现某一种基因型的频率是 $1/2^n$ (n 为检测到的等位点数)^[16]。本研究选择的 10 对核心鉴定引物,共检测到 43 个等位点,因此 2 个品种具有相同基因型的概率为 $1/2^{43}$,这 10 对核心鉴定引物足够对浙江省甚至更大数量的茶树品种进行鉴定。

本研究筛选出 8 个茶树品种,作为浙江省茶树育成品种鉴定的标准品种。对核心鉴定引物在这些茶树品种中的等位点组合之后,能够获得所有 36 个茶树品种的谱带。因此,在进行品种鉴定时,仅需

使用核心鉴定引物扩增这 8 个品种,而无需将所有品种引入试验,能够大大减少工作量,提高检测效率。

在 4 株未知身份茶苗中,NH-01 与乌牛早差异引物对等于 1,因此判定为极相似品种。另引入其余 24 对引物并计算遗传距离,发现遗传距离为 0.107,小于 0.140,因此判定 NH-01 属于乌牛早品种。而茶苗 NH-01、NH-02 和 NH-03 带型一致,与浙江现有品种的差异引物对数均大于 2,因此可判定这 3 株茶苗并非浙江现有品种。对聚类图分析后可知,这 3 株茶苗和乌牛早的遗传距离最近,为 0.220,大于 0.140 的遗传距离临界值,可进一步证明使用核心鉴定引物做的判断是比较准确的。这套核心引物的应用,必将有助于浙江省茶树育种研究的发展。

茶树是多年生木本植物,遗传背景复杂,全基因组测序尚未完成,已报道的茶树 SSR 标记数量仅有 1000 余个^[30-32],仍难以建立均匀分布于茶树基因组的 SSR 标记体系。这些因素,对 SSR 标记构建茶树分子指纹图谱的精确度有一定影响。随着测序技术的发展,茶树全基因组信息必将逐渐被揭示,茶树也将建立完善的分子标记测试体系,进一步提高我国对茶树新品种鉴定和保护的能力。

参考文献

- [1] 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 Genet Genomes*, 2012, 8(1): 205-220
- [2] 陈好. 茶树品种资源检索数据库的构建[D]. 杭州: 浙江大学, 2011
- [3] 肖正东, 程鹏, 马永春, 等. 不同种植模式下茶树光合特性、茶芽性状及茶叶化学成分的比较[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2011, 35(2): 15-19
- [4] 陈亮, 虞富莲, 姚明哲, 等. 国际植物新品种保护联盟茶树新品种特异性、一致性、稳定性测试指南的制订[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(8): 2400-2406
- [5] Schlötterer C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion[J]. *Nat Rev*, 2004, 5: 63-69
- [6] 赵久然, 王凤格, 郭景伦, 等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究, II 适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的核心引物的确定[J]. *玉米科学*, 2003, 11(2): 3-5, 8
- [7] Heckenberger M, van der Voort J R, Melchinger A E, et al. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties: II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data[J]. *Mol Breeding*, 2003, 12: 97-106
- [8] 王凤格, 赵久然, 郭景伦, 等. 中国玉米新品种标准 DNA 指纹库构建研究的几点思考[J]. *植物学通报*, 2005, 22(1): 121-128
- [9] 张金渝, 张建华, 杨晓洪, 等. 玉米 DUS 测试标准品种的 SSR 分子指纹图谱的构建[J]. *玉米科学*, 2006, 14(4): 47-52
- [10] 李根英, Susanne D, Marilyn L W, 等. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 分子标记试剂盒的研发[J]. *作物学报*, 2006, 32(12): 1771-1778
- [11] 李莉, 王俊峰, 颜廷进, 等. 基于 SSR 标记的山东省小麦 DNA 指纹图谱的构建[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(3): 537-541
- [12] 李育强, 陈浩东, 洪亚辉, 等. 湘杂棉 SSR 指纹图谱的构建及应用[J]. *棉花学报*, 2009, 21(3): 175-178
- [13] 崔艳华, 邱丽娟, 常汝镇, 等. 利用 SSR 分子标记检测黄淮夏大豆(*Glycine max*)初选核心样本的代表性[J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(1): 9-15
- [14] 黎毛毛, 黄永兰, 余丽琴, 等. 利用 SSR 标记构建江西稻种资源核心种质库的研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(6): 952-957
- [15] 蔡青, 姜立杰, 张晓明, 等. 苹果主栽品种的 SSR 分子标记鉴别[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(7): 129-134
- [16] 杨阳, 刘振, 赵洋, 等. 湖南省主要茶树品种分子指纹图谱的构建[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(5): 367-373
- [17] 刘本英, 孙雪梅, 李友勇, 等. 20 个云南无性系茶树良种的 DNA 指纹图谱构建[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(4): 720-727
- [18] 乔婷婷, 马春雷, 周炎花, 等. 浙江省茶树地方品种与选育品种遗传多样性和群体结构的 EST-SSR 分析[J]. *作物学报*, 2010, 36(5): 744-753
- [19] 刘本英, 王平盛, 周红杰, 等. 云南茶组植物 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. *云南农业大学学报*, 2006, 21(9): 21-25
- [20] Charters Y M, Wilkinson M J. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 160-166
- [21] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331
- [22] 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
- [23] 庄杰云, 施勇烽, 吕波, 等. NY/T 1433-2007 水稻品种鉴定 DNA 指纹方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007
- [24] 杨剑波, 赵伟, 陈萍, 等. GB/T 20396-2006 三系杂交水稻及亲本真实性和品种纯度鉴定 DNA 分析方法[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- [25] 赵久然, 孙世贤, 王凤格. 中国玉米品种 DNA 指纹鉴定研究动态[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 153-160
- [26] 陆光远, 伍晓明, 张冬晓, 等. SSR 标记分析国家油菜区试品种的特异性和一致性[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(1): 32-42
- [27] Troyer A F, Rocheford T R. Germplasm ownership: related corn inbreds[J]. *Crop Sci*, 2002, 42: 3-11
- [28] 刘红艳, 吴坤, 杨敏敏, 等. 国家芝麻区域试验新品种(系)的 DNA 指纹分析[J]. *作物学报*, 2012, 38(4): 596-605
- [29] Smith J S C, Smith O S. The description and assessment of distances between inbred lines of maize; II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines[J]. *Maydica*, 1989, 34: 151-161
- [30] Ma J Q, Zhou Y H, Ma C L, et al. Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SSR markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae) [J/OL]. *Am J Bot*, 2010: e153-e156
- [31] 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
- [32] 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 Genet Genomes*, 2012, 8(1): 205-220