

SRAP 标记分析陕西省主要茶树种质资源遗传多样性

陈 熙¹, 张 羽^{1*}, 李 佼², 李秀峰², 席彦军²

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 汉中市农业科学研究所, 陕西 汉中 723000)

摘 要:用 6 份有代表性的陕西茶树资源材料,从 154 对 SRAP 引物组合中筛选出 40 对扩增条带清晰、多态性高的引物组合,对陕西省 50 个茶树资源进行遗传多样性研究。结果表明,SRAP 标记能够揭示材料间较高的遗传多样性,共检测到 336 个等位基因,每对引物组合可检测到 5~13 个等位位点,平均为 8 个;每个 SRAP 位点的遗传多态性信息含量在 0.78~1.00 之间,平均值为 0.93。供试材料的遗传相似系数集中在 0.73~0.95 之间。可见,基于 SRAP 标记的陕西省主要茶树资源遗传多样性处于较高水平。

关键词:茶树;SRAP;多样性

中图分类号:S718.46 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)03-0143-05

Analysis of SRAP Marker-based Polymorphism of the Main Tea Germplasms in Shaanxi

CHEN Xi¹, ZHANG Yu^{1*}, LI Jiao², LI Xiu-feng², XI Yan-jun²

(1. School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000, China;

2. Hanzhong Institute of Agricultural Sciences, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: Genetic diversity of 50 tea germplasms in Shaanxi was investigated by using variable renaturing temperature-based PCR. Taking 6 representative tea plants as templates, 40 pairs of SRAP markers were screened out from total 154 pairs of primers, which showed specific and obvious PCR products. The results demonstrated that total 336 alleles were verified using SRAP markers, and about 5—13 alleles were detected by each pair of molecular markers with an average of 8 alleles. The genetic polymorphism information contents of each SRAP locus were between 0.78—1.00, with an average of 0.93. Additionally, the genetic similarities of the 50 varieties were between 0.73—0.95. Based on SRAP markers, the genetic diversity of these tea materials was relatively high.

Key words: tea; SRAP; polymorphism

基于 PCR 的分子标记技术被广泛地应用于基因组 DNA 分析,推动了种质资源的分类、遗传进化、育种、以及基因克隆等方面的研究发展。在茶树遗传资源分析上,应用较多的分子标记有 AFLP、RAPD、SSR、ISSR 和 SRAP。郭娟^[1]等发现 SRAP 标记在美洲黑杨中具有良好的稳定性和丰富的多态性,可以准确的反映各品种间的遗传差异,SRAP 标记的这种优势可以用来鉴定遗传差异较小的品种。L. Chen^[2]等研究表明 RAPD 标记可以识别种间水

平的中国茶树资源。王雪萍^[3]等利用 RAPD 标记对 36 份四川主要产茶区茶树栽培品种的亲缘关系进行分析,聚类结果揭示了 36 份茶树栽培品种遗传差异与材料来源相关。沈程文^[4-5]等运用 SRAP 分子标记与表型鉴定 2 种方法,对 25 份广东茶树种质和 5 份对照品种进行分类,并系统性评价其遗传多样,结果显示 2 种方法的聚类并不完全一致,进将 SRAP 与 ISSR 分子标记进行对比研究,结果表明 ISSR 标记多态性略高于 SRAP 标记,并且 2 种标记

收稿日期:2015-07-20 修回日期:2015-10-20

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2013JZ008);陕西省科技统筹创新工程项目(2013KTZB02-01-01)。

作者简介:陈 熙,女,在读硕士,研究方向:植物分子生物学。E-mail:326906112@qq.com

* 通信作者:张 羽,女,教授,研究方向:植物分子生物学。E-mail:zy68169@sina.com

都能充分揭示各个材料间的遗传多样性。姚明哲^[6-7]等对中国 13 个、日本 4 个与肯尼亚 5 个茶树品种遗传多样性进行 ISSR 和 EST-SSR 标记的分析,自主开发了 55 个 EST-SSR 标记,并利用其研究了 112 份茶树品种(系)的基因分型。刘本英^[8]等对 EST-SSR 和 ISSR 2 种分子标记在 33 份茶树的遗传多样性分析上的应用进行对比研究,结果表明,2 种标记都揭示出 33 份供试茶树品种较高的遗传多样性,ISSR 标记的分析效率要略高于 EST-SSR 标记。丁洲^[9]等优化了 RAPD 反应体系,利用 RAPD 标记分析了 10 个茶树品种的基因组 DNA 的遗传差异,并成功的把 RAPD 标记转化成 SCAR 标记,找到了白毫早和福云 6 号的特异标记。乔婷婷^[10]等以茶树品种龙井 43 幼根为材料,通过构建 cDNA 文库并测序,获得 EST-SSR 标记,并从中选取 63 对浙江省茶树地方品种和选育品种进行遗传多样性和遗传结构分析,结果表明,地方品种的遗传多样性水平略高于选育品种(系)。李赛君^[11]等利用 SSR 标记分析了湖南省茶叶研究所育成的茶树品种与我国茶树无性系品种相比,具有相对较高的遗传多样性。席春奕^[12]等利用 SRAP 标记对 30 份四川茶树种质资源进行遗传多样性与亲缘关系分析,表明 30 份茶树资源的遗传多样性程度较高。刘振^[13]等在茶树品种湘波绿 2 号亲本鉴定上利用了 SSR、SRAP、ISSR 3 种分子标记进行比较分析,结果表明,SRAP 和 ISSR 标记的标记效率较高,而 SSR 标记的多态性丰富。余继忠^[14]以中国选育红绿茶新品种的,2 个主要原始材料福鼎大白茶和云南大叶茶的半同胞系 40 份为研究材料,利用 ISSR 和 EST-SSR 标记分析它们之间的遗传多样性和亲缘关系。代慧萍^[15]等利用 ISSR 对 32 份油茶品种进行遗传多样性分析,研究表明,秦巴山区油茶品种的遗传多样性处于多态水平。

SRAP (sequence related amplified polymorphism,相关序列扩增多样性)标记是根据基因组外显子富含 GC,启动子、内含子及调控序列富含 AT 的保守特点设计独特的双引物^[16]。正向引物针对外显子设计,引物核心序列由 5'端前 10 bp 的填充序列和固定序列 CCGG 组成,加上 3'端 3 个选择性碱基,引物总长 17 bp。反向引物针对内含子等区域设计,5'端的前 11 bp 是一段填充序列,紧接着是 AATT,3'端也是 3 个选择性碱基,引物总长 18 bp。个体间的多样性体现在由于内含子、启动子和间隔序列在不同物种甚至不同个体间的变异上。由于简便、稳定、多态性丰富,已被广泛应用于分析生物的遗传多样性中^[17-21]。

茶树为异花授粉植物,通过长期的自然选择以及人工栽培过程中的天然杂交,造成其复杂的遗传背景。陕西省具有丰富的茶树种质资源,其中包括西乡县大河坝、宁强县广坪、南郑县碑坝以及安康的紫阳群体种等,但长期以来缺乏对种质资源的深入研究。目前,陕西省茶树小部分为外地引进品种,如龙井长叶、龙井 43、福鼎系列、平阳特早等,大部分为地方群体种,而对资源丰富的群体种遗传背景研究很少。本研究利用 SRAP 分子标记研究陕西省主要茶树资源的遗传多样性,深入了解其复杂的遗传背景,以明确各材料间的亲缘关系,为茶树育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料由陕西省汉中市农业科学研究所茶叶试验基地、各县(区)茶叶基地及不同茶区搜集。

1.2 方法

1.2.1 茶叶基因组提取及 PCR 反应 采用 CTAB 提取基因组 DNA,0.8%的琼脂糖凝胶检测茶叶基因组 DNA。

PCR 反应体系:MasterMix 7.5 μL ,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反引物各 1 μL ,50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 1.0 μL ,反应总体积 15 μL ,用 ddH₂O 补足。

PCR 反应程序:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min,35℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,10 个循环;94℃ 30 s,50℃复性 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 5 min,4℃保存。

1.2.2 染色 用 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物,100 bp DNA Ladder 作标记,银染法显色拍照。

1.2.3 数据处理 引物的每一对结合位点在电泳图谱中都显示出每相应的一条扩增带,并将其被视为有效的分子标记。同一引物的扩增产物中具有同源性的条带具有一致的电泳迁移率。每一对引物检测出的每一条多态性带都将作为一个等位变异,并将电泳图谱中清晰显示的条带(不包括弱带)赋值为“1”,无条带时为“0”,缺失时为“9”,利用 NTSYS-pc2.10e 系统软件中 DICE 法计算遗传相似系数,用 UPGMA 进行聚类分析。多态性信息含量 PIC (polymorphism index content) 值通过 J. S. Smith^[22]等的方法计算,计算公式为:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^2 P_{ij}^2 \tag{1}$$

式中的 PIC 值为位点 i 的 PIC 值,其中, P_{ij} 指位点 i 的第 j 个等位位点所出现的频率。

PIC 的取值范围为 0~1,0 表示该位点无多态

性,1 表示该位点具有许多等位位点。根据 D. Botstein^[23]等提出多态性含量指标衡量每个标记的多态性程度,其中低度多态基因座的 $PIC<0.25$, $0.25<PIC<0.5$ 时为中度多态基因座,高度多态基因座的 $PIC>0.5$ 。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物筛选

在 50 个陕西省主要地方茶树资源和引进品种中,选择了 6 份有代表性的材料(龙井长叶,平阳特早,陕茶 1 号,丹桂,宁紫芽中叶,大脚板 1)进行引物筛选,从 154 对引物中,综合考虑 PIC 值大小、扩

增带型统计的难易及引物的重复性高低,筛选出了 40 对较好的 SRAP 引物(表 1)用于遗传多样性研究。

2.2 SRAP 标记的等位变异数,扩增片段多态性

40 对 SRAP 引物在 50 份供试材料间共检测出了 336 个等位变异。平均每对 SRAP 引物检测到 8 个等位变异,每个 SRAP 引物可检测到的等位变异数目为 5~13 个不等。其中引物 me7/em4 扩增出了 13 个等位变异(图 1)。每个 SRAP 位点的 PIC 值变化在 0.78~1.00 之间(表 1),平均值为 0.93,40 个 SRAP 位点为高度多态基因座。其中 me1/em1 引物的 PIC 值达到 0.93(图 2)。

表 1 SRAP 标记及其遗传多态性信息含量

Table 1 Polymorphism information content of SRAP locii

引物	等位位点	多态性信息量	引物	等位位点	多态性信息量	引物	等位位点	多态性信息量
me1/em6	8	0.79	me5/em3	10	0.93	me9/em3	9	0.97
me1/em10	7	0.87	me5/em5	9	0.98	me9/em5	5	0.98
me1/em13	8	0.82	me6/em2	11	0.92	me9/em6	6	0.99
me2/em5	9	0.98	me6/em3	11	0.85	me9/em9	7	1.00
me2/em9	8	0.94	me7/em4	13	0.95	me9/em14	8	0.90
me2/em11	9	0.95	me7/em9	12	0.84	me10/em5	9	0.97
me2/em14	10	0.85	me7/em12	8	0.80	me10/em7	8	0.96
me3/em1	8	0.86	me7/em14	7	0.92	me10/em13	5	0.93
me3/em8	9	0.78	me8/em2	5	0.96	me10/em14	8	0.99
me4/em1	12	0.95	me8/em4	11	0.94	me11/em4	6	0.96
me4/em2	11	0.98	me8/em8	10	0.95	me11/em5	6	1.00
me4/em3	7	0.99	me8/em13	8	0.94	me11/em7	5	0.97
me4/em7	8	0.96	me9/em2	7	0.97	me11/em14	10	0.98
me5/em2	10	0.96						

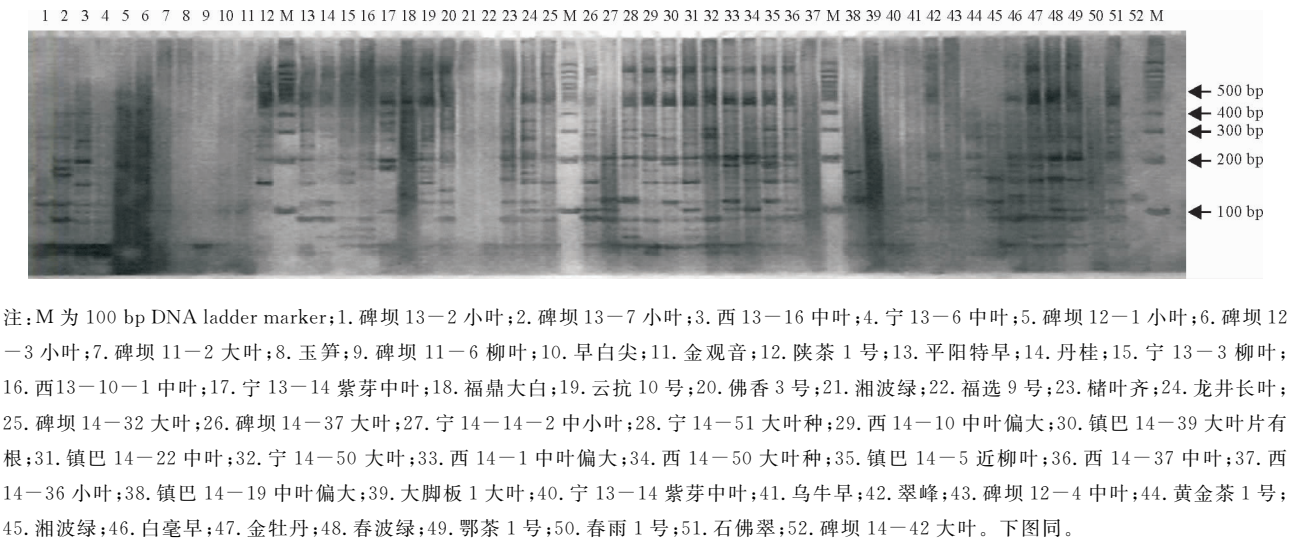


图 1 引物 me7/em4 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results with primer me7/em4

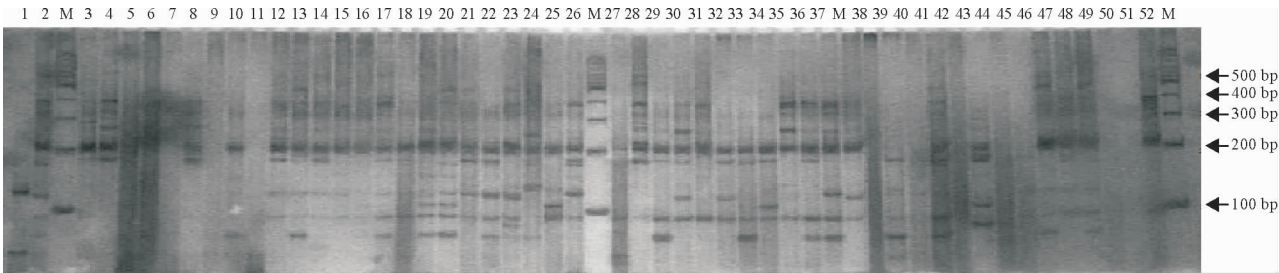


图 2 引物 me1/em1 的扩增结果

Fig. 2 Amplification results with primer me1/em1

2.3 供试材料间的遗传相似系数

基于 SRAP 标记数据的材料两两间遗传相似系数的变异范围为 0.40~0.91,平均值为 0.60,其中春波绿和金观音间的相似系数最低(0.40),而春雨一号和碑坝 12~3 间的相似系数最高(0.91)。50 个供试材料两两计算其相似度,共获得 1 225 个遗传相似系数,在以 0.02 为组距进行次数分布分析时,50 个供试材料间的遗传相似系数在 0.65 处分布密度最大,两侧不对称。经卡平方测验,不符合正态分布($p < 0.01$),呈左偏态分布。 <0.65 的有 752 个,占 64.33%, >0.65 的遗传相似系数有 437 个,占 35.67%,主要分布在 0.49~0.69 之间,占

85.06%(1 042/1 225)(图 3)。

2.4 聚类分析

SRAP 标记分析的遗传相似系数和聚类,在相似系数为 0.62 处,将 50 份材料聚为 3 大类。第 1 大类包括碑坝 13-2 小叶种、碑坝 12-1 小叶种、乌牛早、碑坝 12-4 中叶种等 12 个材料。第 2 大类包括碑坝 13-7 小叶、宁 13-3 柳叶、镇巴 14-22 中叶等 25 个材料。西 13-16 中叶、宁 13-6 中叶、陕茶 1 号、碑坝 11-2 大叶等 13 个材料聚为第 3 大类。表明地方群体种大多聚类在一起,小部分与引进品种亲缘关系接近(图 4)。

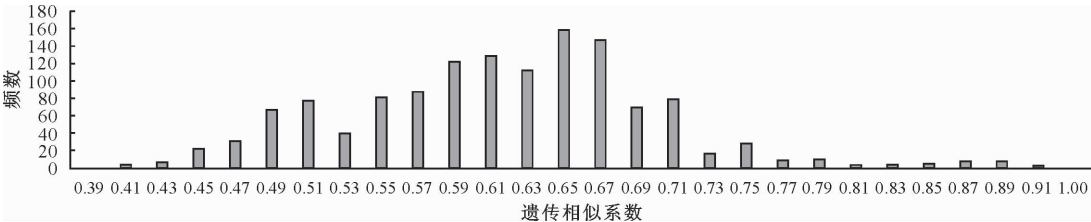


图 3 供试材料间遗传相似系数的频率分布

Fig. 3 Distribution of genetic similarity between materials

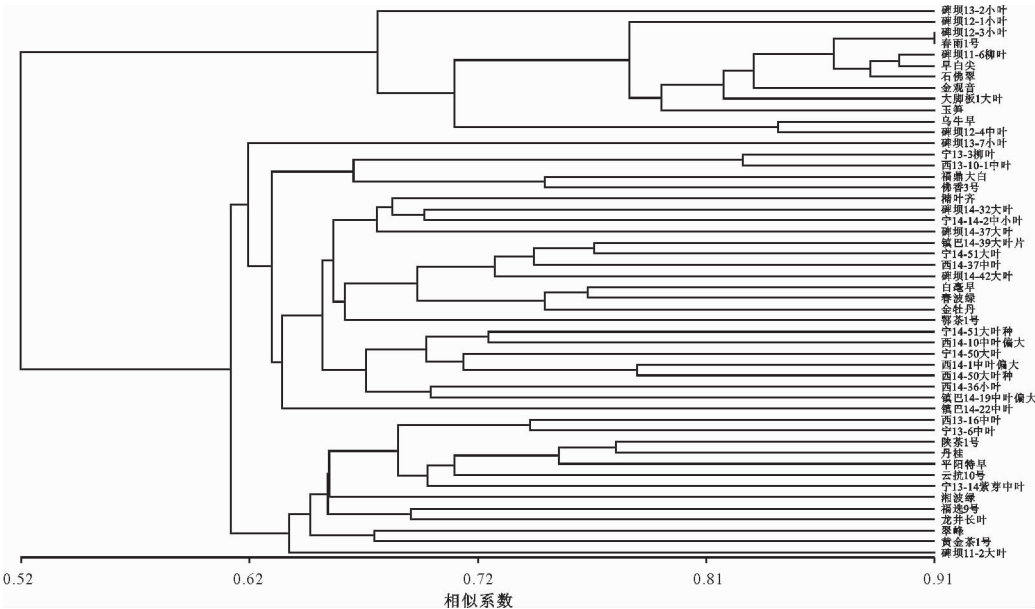


图 4 SRAP 标记分析的遗传相似系数数据构建的 50 份茶树资源的聚类分析

Fig. 4 Dendrogram of genetic similarity among 50 tea plants based on SRAP data

3 结论与讨论

茶树是中国重要经济作物之一,茶叶的商品价值与茶树品种密切相关。陕西省茶树属于江北茶区,传统育种方法以系统选育为主,从自然杂交后代中分离优良单株,通过表型性状筛选鉴定,但育种工作进展较为缓慢。分子标记能够排除环境影响,客观真实研究材料的遗传基础,快速鉴定品种,缩短育种年限。本研究利用 SRAP 标记分析了陕西茶树资源的遗传多样性,50 份供试材料包括陕南茶区引进品种及主要群体种。群体种资源来自了西乡县大河坝(8 份)、南郑县碑坝(10 份)、宁强县广坪(6 份)和镇巴县兴隆(4 份),28 份群体种均为重要的地方品种,其遗传背景尚不清楚。通过本研究发现 SRAP 标记能够较好的区别各材料,可用于现有品种和育种材料的筛选鉴定,为育种工作提供有力帮助。分析供试的茶树材料的扩增片段多态性和遗传相似系数,反映出茶树遗传多样性较高,但地方群体育种材料间遗传相似性较大,系统育种还需扩大选种范围。聚类分析将亲缘关系相近的本地群体种材料聚类在小类,但引进品种聚类结果只有部分符合系谱,如佛香 3 号和福鼎大白,与系谱偏离可能由于茶树为异花授粉植物,在人工栽培过程中与其他品种长期进行天然杂交,致使茶树栽培品种群体存在一定的遗传变异。地方群体种由于各茶区地理距离较近,并没有严格按照来源地聚类,大叶种基本被划为相近的类群,说明聚类结果不仅与茶树来源地有关,也与茶树的植物学特性紧密相关。

本研究利用 SRAP 分子标记分析了陕南茶树品种在分子水平的遗传差异,为系统选育和杂交育种工作提供了一定理论基础。系统选育需要在现有育种材料基础上继续增加筛选材料,增加遗传多样性,杂交组合选配时需要以遗传背景差异大的材料作亲本。本研究可为科学研究和评价陕西茶树资源、合理开发和利用陕西省茶树种质资源以及育种工作提供参考。

参考文献:

[1] 郭娟,樊军锋,梁军,等. 利用 SRAP 标记鉴别美洲黑杨及指纹图谱构建[J]. 西北林学院学报,2014,29(2):98-102.
GUO J, FAN J F, LIANG J, *et al.* Identification and fingerprinting of populus deltoides using SRAP markers[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(2): 98-102. (in Chinese)

[2] CHEN L, YAMAGUCHI S. RAPD markers for discriminating tea germplasms at the inter-specific level in China[J]. Plant Breeding, 2005, 124(4): 404-409.

[3] 王雪萍,马炳田,齐桂年,等. 四川主栽茶品种亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2007,34(1):142-244.
WANG X P, MA B T, QI G N, *et al.* RAPD Analysis on the genetic relationships of tea cultivars grown in Sichuan[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(1): 142-244. (in Chinese)

[4] 沈程文,宁正祥,黄建安. 基于表型参数及 SRAP 标记的广东茶树种质遗传多样性[J]. 应用生态学报, 2009, 20(7): 1551-1558.
SHEN C W, NING Z X, HUANG J A. Genetic diversity of *Camellia sinensis* germplasm in Guangdong Province based on morphological parametrs and SRAP markers[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(7): 1551-1558. (in Chinese)

[5] 沈程文,黄建安,赵世浩,等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析广东茶树种质资源的遗传多样性[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 948-955.
SHEN C W, HUANG J A, ZHAO S H, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Camellia sinensis* germplasm in Guangdong Province by SRAP and ISSR markers[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(5): 948-955. (in Chinese)

[6] 姚明哲,陈亮,马春雷,等. ISSR 和 EST-SSR 标记在检测中国、日本和肯尼亚茶树品种遗传多样性上的比较分析[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 897-903.

[7] 姚明哲,乔婷婷,马春雷,等. EST-SSR 标记与茶树表型性状关联的初步分析[J]. 茶叶科学, 2010, 30(1): 45-51.

[8] 刘本英,孙雪梅,李友勇,等. 利用 ISSR 和 EST-SSR 标记分析茶树遗传多样性的比较[J]. 热带作物学报, 2009, 30(11): 1577-1581.

[9] 丁洲,江昌俊,陈聪,等. SCAR 标记在茶树种质资源鉴定中的应用[J]. 激光生物学报, 2009, 18(6): 819-824.
DING Z, JIANG C J, CHEN C, *et al.* Application of SCAR marker in germplasm identification of *Camellia sinensis* [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2009, 18(6): 819-824. (in Chinese)

[10] 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.
QIAO T T, MA C L, ZHOU Y H, *et al.* EST-SSR genetic diversity and population structure of tea landraces and developed cultivars (lines) in Zhejiang Province, China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(5): 744-753. (in Chinese)

[11] 李赛君,王旭,段继华,等. 16 个茶树品种(系)遗传多样性及遗传结构 SSR 标记分析[J]. 湖南农业科学, 2011(23): 6-9.

[12] 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 C Y, TANG Q, WU Y S, *et al.* Genetic diversity and relationship of 30 tea plant germplasms in Sichuan Revealed by SRAP Marker [J]. Guizhou Agricultural Science, 2013, 41(2): 6-9. (in Chinese)

[13] 刘振,赵洋,杨培迪,等. SSR、SRAP、ISSR 分子标记在茶树品种亲本鉴定上的比较分析[J]. 茶叶科学, 2014, 34(6): 617-624.

[14] 余继忠. 福鼎大白茶半同胞系和云南大叶茶半同胞系遗传多样性和亲缘关系的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.