

# 利用 ISSR 标记对恩施州茶树种质资源 亲缘关系鉴定的研究

李卫东,崔清梅,张 强,侯伟华,袁程晓,梁金波,戴居会  
(恩施州农业科学院,湖北 恩施 445000)

**摘要:**为更好地收集、保存和研究茶树品种资源,从 2008 年开始应用 ISSR 分子标记技术,对恩施州茶树资源的亲缘关系和遗传多样性进行了研究。结果表明:采用 CTAB 法提取 DNA,探索出茶树 PCR 扩增效果较好的反应体系及反应程序,筛选出 28 条左右多态性较高的 ISSR 引物,用类平均法进行聚类分析,得出供试品种遗传关系树状图。基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类图中,在遗传相似性系数为 0.64 处,183 份茶树种质资源被划分为两大类。

**关键词:**恩施茶树;种质资源;ISSR;亲缘关系

**中图分类号:**S571.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1002-2767(2011)12-0007-03

茶叶栽培在恩施州历史悠久,长期以来经过不断的自然杂交和环境条件的影响,演变成丰富的茶树种质资源。乔木、小乔木和灌木型茶树俱全,有多酚类含量极高和氨基酸含量极高的单株,有抗性强、变异的优良品种,如茶山 1 号、巴东长叶、鹤苔早、恩苔系列、宣恩 27、鹤峰大坪大茶树、溪丘 2 号、兴隆 7 号、茶园 51 号、毛坝 7 号、忠路 7 号、鸡冠茶、花枝茶等,还有好多优良单株和群体在开发研究。

从 DNA 分子水平上研究恩施州茶树资源的亲缘关系和遗传多样性<sup>[1]</sup>,属于科研创新。从 2008 年开始应用 ISSR<sup>[2-4]</sup> 分子标记技术,对恩施州茶树资源的亲缘关系进行分析,为恩施茶树资源的收集、保存、利用奠定基础;为今后恩施茶树核心种质库建立以及 DNA 图谱构建提供依据;为茶树育种,杂交亲本的选择及茶树品种知识产权的保护提供证明。ISSR(简单重复序列区间)由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等于 1994 年提出<sup>[5]</sup>,通常为显性标记,呈孟德尔式遗传,具有很好的稳定性和多态性、DNA 用量少、成本低等特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

该试验所用茶树种质部分从野外采集,其它

来自恩施州农业科学院茶叶资源圃中(见表 1)。

表 1 部分茶树资源及采集地点

编号	名称	采集地点	编号	名称	采集地点
126	龙井 43	资源圃	146	大集 4 号	盛家坝
127	白毫早	白果	147	大集 5 号	盛家坝
128	宣苔早	宣恩	148	金星 1 号	明星湾
129	鹤苔早	鹤峰	149	金星 2 号	明星湾
130	鄂茶 1 号	宣恩	150	金星 3 号	明星湾
131	碧香早	屯堡	151	金星 4 号	明星湾
132	安吉白茶	咸丰	152	芭蕉 1 号	原茶科站
133	恩苔早	芭蕉	153	芭蕉 2 号	原茶科站
134	恩苔 1 号	芭蕉	154	芭蕉 3 号	原茶科站
135	恩苔 8 号	芭蕉	155	芭蕉 4 号	原茶科站
136	恩苔 27	芭蕉	156	芭蕉 5 号	原茶科站
137	恩苔早 1 号	芭蕉	157	芭蕉 6 号	原茶科站
138	恩苔早 2 号	芭蕉	158	芭蕉 7 号	原茶科站
139	茶山 1 号	芭蕉	159	芭蕉 8 号	原茶科站
140	金星 18	芭蕉	160	芭蕉 9 号	原茶科站
141	恩茶红	利川	161	芭蕉 10 号	原茶科站
142	花枝茶	屯堡	162	芭蕉 11	原茶科站
143	大集 1 号	盛家坝	163	芭蕉 12	原茶科站
144	大集 2 号	盛家坝	164	芭蕉 13	原茶科站
145	大集 3 号	盛家坝	165	芭蕉 14	原茶科站

供试主要试剂有 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、硼酸、EDTA、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、液氮、浓盐酸、氯仿、PVP、异丙醇、EDTA-Na(乙二胺四乙酸二钠)、β-巯基乙醇、无水乙醇、溴酚蓝、100 bp DNA Ladder、琼脂糖(Agarose)、琼脂粉、

收稿日期:2011-08-17  
基金项目:湖北省农业科技创新中心资助项目(2007-620-001-03)  
第一作者简介:李卫东(1961-),男,湖北省恩施市人,高级农艺师,从事茶树育种栽培研究。

EB(溴化乙锭)、Arc(丙烯酰胺)、Bis(亚甲基双丙烯酰胺)、TEMED、过硫酸铵、硝酸银、甲醛和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取方法 采用 CTAB 法提取从野外采集回来的茶树鲜叶的 DNA<sup>[6]</sup>。将提取的 DNA 放进  $-20^\circ\text{C}$  冰箱进行保存。参照原先茶树 DNA 提取的方法,结合茶树特点,对茶树不同部位的 DNA 进行比较分析,并对原先方法进行改良,摸索出一套操作简便、快速和准确的高质量茶树 DNA 提取及纯化技术。

1.2.2 ISSR 产物的检测 当在 DNA 扩增仪扩增结束后,用含  $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB(溴化乙锭)染色,在紫外分析仪上检测扩增产物,用凝胶成像系统照相并保存。根据 PCR 结果,确定最佳反应体系和反应程序。

1.2.3 PCR 扩增及电泳 对提取的 DNA 用筛选出的 28 条引物对供试材料逐一进行扩增并记录结果。ISSR-PCR 扩增产物在  $1\times\text{TBE}$  缓冲液中,用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳 90 min,电压 150 V。

扩增程序:  $94^\circ\text{C}$  5 min,  $94^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $56^\circ\text{C}$  退火 40 s,  $72^\circ\text{C}$  2 min,  $72^\circ\text{C}$  完全延伸 7 min, 34 个循环,  $4^\circ\text{C}$  保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 合成和筛选引物

从随机选择的 65 条 ISSR 引物中选出对供试茶树材料能够扩增出清晰的谱带和重复性好的 28 条引物(见表 2)。不同引物对资源鉴定和亲缘关系的分析结论有差异,要选择一定数量的引物对试验材料进行扩增。

表 2 合成引物序列

编号	序列	编号	序列
807	(AG)8T	842	(GA)8YC
808	(AG)8C	843	(CT)8RA
813	(CT)8T	844	(CT)8RC
815	(CT)8G	845	(CT)8RG
816	(CA)8T	847	(CA)8RC
818	(CA)8G	848	(CA)8RG
825	(AC)8T	853	(TC)8RT
827	(AC)8G	854	(TC)8RG
834	(AG)8YT	855	(AC)8YT
835	(AG)8YC	856	(AC)8YA
836	(AG)8YA	857	(AC)8YG
840	(AG)8YT	866	(CTC)6
841	(GA)8YT	873	(GACA)4
880	(GGAGA)3	881	(GGGTG)3

### 2.2 ISSR 标记数据统计与扩增结果

28 条引物共扩增出 340 个条带,其中多态性带 328 条,多态性比率为 96.47%。单个 ISSR 引物扩增的 ISSR 条带数在 7~18 条,平均每条引物扩增出 12.14 条多态性条带,多态性最高为 100%,最低为 87.5%。产物的大小介于 100~2 800 bp。

### 2.3 茶树种质资源 ISSR 分析

根据 ISSR 扩增产物的电泳结果,用 ISSR 标记数据计算样品间的遗传相似性系数,结果表明,183 份供试材料间的遗传距离系数较大,两两之间遗传相似性系数分布于 0.52~0.93,茶树种质

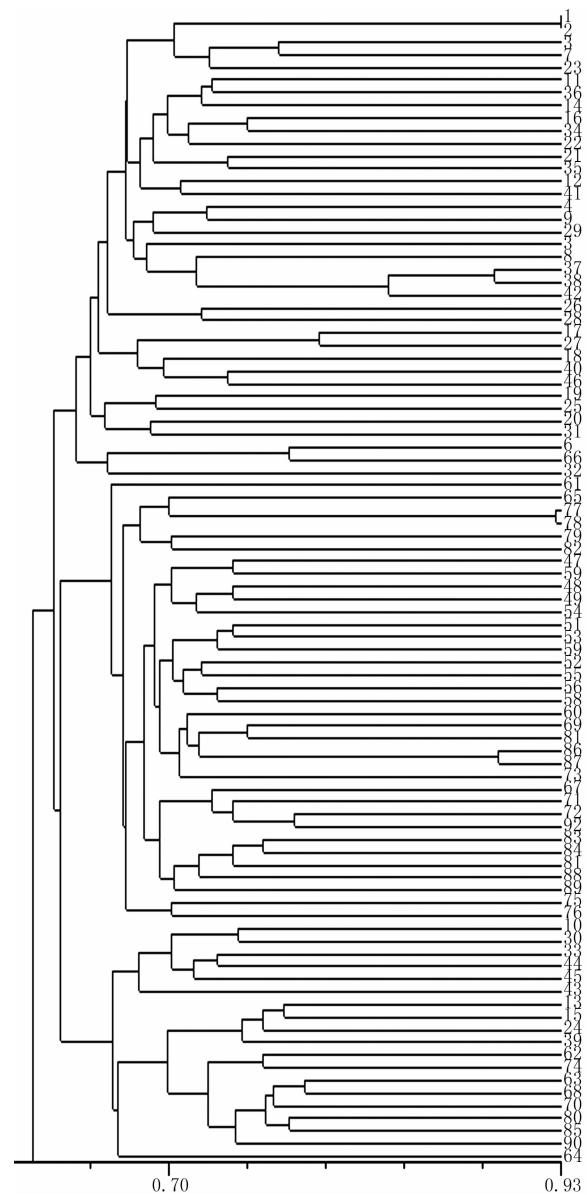


图 1 根据 ISSR 数据计算的部分材料之间亲缘关系聚类图

资源存在较大的遗传变异性。在这些茶树种质资源中,资源圃中的 1 号与 2 号,37 号与 38 号,77 号与 78 号,86 号与 87 号的遗传距离很近,其中 1 号与 2 号间相似度最高,相似系数为 0.93,说明它们之间的亲缘关系很近,遗传差异很小。

用类平均法进行聚类分析,得出供试品种遗传关系树状图(见图 1)。结果表明:基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类图中,在遗传相似性系数为 0.64 处,183 份茶树种质资源被划分为两大类。第 I 类包括 91 份,且分为 3 个亚类,全部为资源圃中的资源。第 II 类包括 92 份,分为 7 个亚类,其中 2 个为独立的类。

### 3 结论

该研究对恩施州地方茶树种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行分析,以茶树嫩叶为材料,对茶树基因组 DNA 提取的方法、ISSR 程序的建立和扩增,结果表明,ISSR 标记技术方法简单、稳定、经济、高效,成本低,重复性好,利用 ISSR 分子标记对茶树进行的遗传多样性和亲缘关系分析

以及 DNA 指纹图谱的建立,可以作为茶树鉴定品种的主要依据。但是分子标记检测的是植物基因组的碱基序列,与表型无关,应将分子标记与形态标记相结合。

### 参考文献:

- [1] 陈亮,虞富莲,杨亚军,等. 茶树种质资源与遗传改良[M]. 北京:中国农业科学出版社,2006.
- [2] 侯渝嘉,何桥,李中林,等. 应用 ISSR 分子标记对茶树种质资源进行分子鉴定[J]. 西南农业学报,2007,20(6): 1272-1276.
- [3] 唐玉海,郭春芳,张木清,等. ISSR 标记在茶树品种遗传多态性研究中的应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2007,36(1):51-55.
- [4] 郭春芳,唐玉海,孙云,等. 茶树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报,2008,29(2):181-186.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) 2 anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [6] 孙亮,陈大明,高其康,等. 茶树基因组 DNA 提纯与鉴定[J]. 茶叶科学,1997,17(2):177-181.

## Identification of Tea Germplasm Genetic Relationship in Enshi by ISSR Markers

LI Wei-dong, CUI Qing-mei, ZHANG Qiang, HOU Wei-hua, YUAN Cheng-xiao, LIANG Jin-bo, DAI Ju-hui

(Enshi Academy of Agricultural Sciences, Enshi, Hubei 445000)

**Abstract:** For the purpose of collecting, conserving and researching tea germplasm, the relationship and genetic diversity of Enshi local tea germplasm have been studied since 2008 by ISSR markers. The results showed that reaction system and response procedures with good PCR amplification effect of the tea tree were explored using CTAB law to extract DNA, 28 about higher ISSR polymorphism primer were selected, the genetic relationship phylogenetic tree of the tested varieties was obtained by an average of clustering analysis method. The results showed that based on the genetic similarity coefficient groups by UPGMA cluster figure, at the genetic similarity coefficient was 0.64 place, 183 tea tree germplasm resources were divided into two categories.

**Key words:** Enshi tea; germplasm resources; ISSR; genetic relationship

### 寒地水稻优化施肥技术简介

随着各种高产栽培技术的推广应用,黑龙江省水稻单产、总产都有了大幅度的提高。但目前黑龙江省农民施肥还存在着很大的盲目性,特别是氮肥施用量过高、氮肥施用时期不合理等问题严重。这种施肥方式使水稻无效分蘖增多,群体质量恶化,病害加重,结实率低,出米率低,碎米多,成为寒地水稻高产栽培中普遍存在的问题。

水稻优化施肥技术主要是依据土壤供肥能力和水稻的目标产量来确定氮、磷、钾肥的总用量,利用叶龄来确定水稻生育期,在主要生育期,根据叶色卡的数值确定氮肥追施量,以最大限度地满足水稻高产群体各个时期对养分的需求。优化施肥中氮的调控原则是,适当控制移栽至拔节前的氮肥用量,增加穗分化期至抽穗期的氮肥用量,使氮肥的施用与水稻最大吸氮时期相一致。通过 6 a 20 多个点次的试验,证明应用水稻优化施肥技术可使氮肥用量减少 20% 左右,水稻结实率提高 5 个百分点,千粒重增加 0.6~2.0 g,产量平均提高 10%,产量达到 9 000 kg·hm<sup>-2</sup>,并可显著防止水稻倒伏,减少病害发生。