

茶树遗传演化研究进展及 SSR 在茶树遗传演化研究中的应用前景

周炎花^{1,2}, 姚明哲², 陈亮², 孙威江¹

(¹福建农林大学, 福州 350002;

²中国农业科学院茶叶研究所/国家茶树改良中心, 杭州 310008)

摘要: 茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 起源于中国的西南地区, 在由起源地向中国其他地区 and 世界其他地区传播的过程中, 发生了从形态学水平到细胞水平再到分子水平的一系列演化。对茶树遗传演化的研究, 是茶树基础生物学的一个基本问题, 也是茶树种质资源研究的重要方面。近年来, 各种新技术、新方法被广泛应用于研究茶树遗传演化关系, 取得了一定的进展。从形态学、细胞学、生物化学、分子生物学方面对茶树遗传演化研究取得的进展进行了综述, 分析了 SSR (Simple Sequence Repeat) 标记在植物遗传演化中的应用, 探讨了 SSR 标记在茶树遗传演化研究中的应用前景, 旨在为进一步深入研究中国茶树遗传多样性、亲缘关系及演化路径分析提供参考。

关键词: 茶树; 遗传演化; 研究进展; SSR

中图分类号: S3 文献标识码: A 论文编号: 2009-0661

Research Progress of Tea Genetic Evolution and the Application Prospects of SSR in Tea Genetic Evolution

Zhou Yanhua^{1,2}, Yao Mingzhe², Chen Liang², Sun Weijiang¹

(¹Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

²Tea Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Center for Tea Improvement, Hangzhou 310008)

Abstract: Tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze], which originated in the southwest of China, took place a series of evolution from the level of morphology to the cytology level and to molecular level as it spread from the original center to other parts of China and elsewhere in the world. The research on the tea genetic evolution is not only a fundamental issue of tea biology but also an important aspect of the study of tea genetic resources. In the recent years, new technologies and methods have been widely applied in the study of the genetic evolution of tea plant. Some significant progress had been made so far. In this paper, we summarized the studies on the tea genetic evolution in the aspects of morphology, cytology, biochemistry and molecular biology of tea plant. The applications of SSR markers in genetic evolution of plants and its prospects in tea plant were discussed. The purpose is to provide some references for further study of the genetic diversity of tea in China and related analysis of the evolution.

Key words: tea plant (*Camellia sinensis*), genetic evolution, progress, SSR

基金项目: 国家“863”计划“茶树茶多酚生物合成途径中重要基因的分离克隆与调控研究”(2006AA10Z171); 公益性行业(农业)科研专项“名优绿茶高效栽培及加工关键技术研究”(nyhyzx07-021); “现代农业产业技术体系建设专项资金资助”。

第一作者简介: 周炎花, 女, 1983年出生, 硕士研究生, 主要从事茶树分子生物学研究。通信地址: 310008 杭州市梅灵南路9号中国农业科学院茶叶研究所。

通讯作者: 陈亮, 男, 1967年出生, 博士/研究员, 博士生导师, 主要从事茶树种质资源、遗传育种与分子生物学研究。Tel/Fax: 0571-86652835; E-mail: liangchen@mail.tricaas.com。孙威江, 男, 1964年生, 博士/教授, 博士生导师, 主要从事茶学教学研究, E-mail: swj8103@126.com。

收稿日期: 2009-03-31, **修回日期:** 2009-05-06。

0 引言

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 为多年生常绿木本植物, 起源于中国的西南地区^[1-5], 然后从起源中心向中国其他地域自然传播、从中国向世界其他地区人为传播, 又由于茶树自身的异花授粉与人为的变异选择, 发生了从形态水平到细胞水平、生物化学水平、再到分子水平的一系列连续的、渐进的变化^[6], 进而形成了今天丰富的种质资源。有关茶树的分类和演化的问题直接关系到茶树育种工作的开展, 而对于系统分类的研究能够更好地理解和研究茶树遗传演化的各种特征。对各水平演化的研究, 是研究茶树种质资源遗传演化关系的重要组成部分, 从不同层面提出了茶树的遗传演化途径。笔者拟对此方面的研究成果作一综述, 为进一步深入研究提供参考。

1 茶树的分类

广义的茶树包含山茶属茶组 [*Camellia* L. Sect. *Thea* (L.) Dyer] 所有种和变种。近年来, 人们以遗传比较稳定的花部器官的形态特征为主, 兼顾考虑树型、叶片特征和地理分布等多种因素, 结合化学分类等来研究茶树种质资源的系统分类, 取得了丰硕的成果。

目前茶组植物分类系统主要有席勒系统^[7]、张宏达系统^[8-10]、闵天禄系统^[11-12]等。席勒的茶组有 5 种 1 变种。张宏达以花器官的分化程度, 尤其以子房室数、子房茸毛的有无、以及花柱裂数为主要依据, 对茶树进行了系统分类, 将茶组植物分成五室茶系 (*Ser. Quinquelocularis* Chang)、五柱茶系 (*Ser. Pentastylae* Chang)、秃房茶系 (*Ser. Gymnogynae* Chang) 和茶系 (*Ser. Sinenses* Chang) 4 系 44 种 4 变种。而闵天禄在张氏系统基础上将茶组和秃茶组 Sect. *Glaberrima* Chang 共 47 种和 3 变种进行归并, 将秃茶组并入茶组, 把原茶组的毛肋茶因花柱离生而归入离蕊茶组 (*Sect. Corallina* Sealy), 最后茶组植物调整为 12 种和 6 变种^[13]。

在前人的基础上, 根据对茶树种质资源多年的系统研究和对茶树原产地茶树特征特性的全面考察, 陈亮等^[14]以子房室数、花柱裂数和子房茸毛有无为主要依据, 结合花冠大小、树型和枝叶性状, 提出将茶组植物分成大厂茶 *Camellia tachangsis* F. C. Zhang、大理茶 *C. taliensis* (W. W. Smith) Melchior、厚轴茶 *C. crassicolonna* Chang、秃房茶 *C. gymnogyna* Chang、茶 *C. sinensis* (L.) O. Kuntze 等 5 种, 在茶种下分阿萨姆茶 *C. sinensis* var. *assamica* (Masters) Kitamura 和白毛茶 *C. sinensis* var. *pubillimba* Chang 等 2 变种。

2 形态学水平的演化

茶树的根、茎、叶、花、果实和种子等形态和结构

往往因其所处的地理和气候条件及栽培管理措施而有所差别, 形态学水平演化主要包括植物学特征、叶片、及花粉形态特征的演化。

2.1 植物学特征

张宏达^[8]认为, 山茶属植物的系统演化表现在心皮或子房的数目、茸毛、花柱、花冠大小、果实发育、中轴等花果形态特征, 以及树型、枝叶等特征, 并以此为演化轴线。并认为, 花冠大 (直径大于 5.0 cm)、花瓣数目众多而离生的花瓣数目少而连生的原始; 子房 5 室、花柱 5 条, 比子房 3 室、花柱 3 裂的原始得多; 子房几个心皮全部能育、蒴果具有粗大中轴的基本结构的, 较蒴果只有一室能育、中轴不明显的原始; 乔木型、大叶厚革质等比小乔木、灌木型中小叶的要原始。

山茶属植物的形态特征 (包括花粉形态和细胞学特征) 是相对稳定和一致的, 但经仔细观察和研究, 闵天禄和张文驹^[15]认为山茶属植物在系统发育过程中形态性状存在着有规律的变异, 并提出其主要的演化趋势, 其观点同张氏的基本一致。

在张宏达等研究的基础上, 陈亮^[16]结合对茶树种质资源多年的系统研究和对茶树原产地茶树特征特性的全面考察, 推测原始茶组植物分两条路线演化, 第一条: 从子房 5 室的原始茶组植物向子房 5 室、无茸毛的大厂茶演化, 再由大厂茶向子房 3 室、无茸毛的秃房茶演化; 第二条: 从子房 5 室的原始茶组植物向子房 5 室、具茸毛、大花冠的厚轴茶、大理茶演化, 再由大理茶向花小子房 3 室、多茸毛的普洱茶、白毛茶和茶演化。

2.2 叶片解剖结构

植物对环境的演化适应, 较多反映在叶的结构上^[17]。叶表皮和叶的解剖学特征因其稳定性已被证明在系统分类中具有较大作用, 不少研究发现叶表皮性状在一定程度上能反映分类群间的系统发生规律^[18-19]。茶树叶片是典型的背复叶, 有明显的栅栏组织、海绵组织, 上表皮是同型细胞, 下表皮有气孔和茸毛的分化。据严学成^[20]对野生型和栽培型茶树的叶片研究发现二者的解剖结构存在很大差异, 认为茶树从野生型演化到栽培型, 角质层由厚到薄, 表皮细胞从波浪形向圆形或微波形, 叶肉从厚到薄, 栅栏组织从 1 层到 2-3 层, 硬化细胞从多到少, 硬化细胞的形状由树型 → 星形 → 骨头状 → 纺锤状 → 毛状逐渐演化。

另外, 束际林^[21]对乔木型、小乔木型和灌木型的叶肉结构进行了比较研究发现, 乔木型的叶肉厚度和海绵组织厚度大于小乔木、灌木; 而栅栏组织厚度以小乔木型的和灌木型的较大; 乔木型茶树与灌木型茶树叶绿体结构的主要区别在于乔木型茶树类囊体较大, 排

列较整齐,基粒片层、基质片层较疏松,膜纹较粗且排列整齐,结构单一。认为茶树叶绿体结构的演化基本上是由简单到复杂。

2.3 花粉形态特征

植物的花粉形态及外壁结构各具特色。花粉与其他组织器官相比其性状更稳定,不但具种属特异性,还对腐蚀及各种化学物质有抵抗力,环境因素对它形态特征的影响较小。因此,可以从茶树花粉形态的演化规律来探讨其起源和演化。

按照被子植物的进化系统,茶树花冠直径原始型大于进化型,由子房5室和花柱4-5裂向子房3室和花柱3裂演化。束际林和陈亮^[22]对原始型、过渡型、进化型共计15份茶树种质资源的花粉形态进行了观测,根据其差异,认为茶树花粉大小及P/E(极轴/赤道轴)值有由大向小演化的趋势,同时发现P与P/E呈直线正相关,相关系数为0.8499,认为花粉的P/E值用于探讨茶树的起源和演化具有一定的意义;并认为花粉萌发孔由沟形向梭形、椭圆形或长方形演化。这与Walker认为的花粉体积小者为进化类群,大者为原始类群的观点一致^[23]。其他同类研究认为,茶树花粉表面纹饰由光滑型向粗糙型演化^[21,24]。

但是由于花粉在演化过程中各种特征进化的程度不同,引起了性状的不一致,有时会出现既有原始特征,又有进化性状,即所谓的镶嵌进化^[22]。又由于茶树属于异花授粉植物,其种质资源之间会相互渗透,反映在演变过程的很多过渡类型中^[24]。这些给研究茶树花粉的演化规律带来了很大的困难,所以必须掌握其主要变化趋势,才能得出比较客观的结果。

3 细胞学水平的演化

近几十年来,利用细胞学方法开展茶树种质资源的研究,取得了一系列进展。其中,染色体组型分析是茶树细胞学的主要研究内容之一,它对探讨茶树遗传演化有重要的意义。

3.1 染色体数目

染色体数目在大类群之间、属间、种间甚至种内都可能发生变化,能为分类学和进化研究提供分类群内细胞学多样性的线索。

茶组植物的染色体研究有较长的历史。Morinaga等(1929)首次报道了茶*C. sinensis*的配子染色体数 $n=15$ 。1932年Karasawa首先发现茶的三倍体类型 $2n=45$ 。在张宏达^[25]系统的37种茶组植物中,已有17种2变种做过染色体计数。茶树细胞学的研究证实,茶群体细胞染色体以 $x=15$ 为基数,一般为 $2n=2x=30$,也有三倍体 $2n=3x=45$ 、四倍体 $2n=4x=60$ 、五倍体 $2n=5x=75$

和单倍体 $x=15$ 等整倍性以及染色体为24~31条不等的非整倍性变异^[6]。

3.2 染色体核型演化

植物核型的对称性反映了其进化程度,对称性高的较对称性低的原始。据李光涛研究发现野生茶染色体核型的对称性较高,在进化上比较原始^[26]。李懋学和严学成对野生茶树核型的研究也发现其对称性较高^[27];李斌等系统地研究了18个茶树栽培品种的核型,发现云南大叶茶对称性最高,龙门毛叶茶染色体核型的对称性较低;乔木型茶树的对称性高于灌木型品种,大叶类品种大于中小叶类,华南、西南地区的品种大于其他地区的品种^[28-29]。对5个大叶茶树的染色体组型进行了分析发现,其核型对称性的由大到小顺序为:邦崴大叶茶树→阿萨姆种→云南大叶种、越南大叶种→掸部大叶种。即云南邦崴大茶树在进化上较原始^[30]。

梁国鲁等研究表明,茶组植物染色体核型的对称性,以子房五室的为高,子房3室的较低;并认为茶组植物的演化,可能是在二倍体水平上,多倍体并不是其进化的主要趋势^[31]。这与李懋学和严学成^[27]的观察结果一致。而有关茶*C. sinensis*的种内多倍体,则可能因茶树多倍体具有重要的经济性状,经人工长期的选育和栽培的结果。

根据植物染色体的进化是从对称的核型向不对称的核型演化,不对称核型的物种进化程度较高的理论,以上研究对探讨茶树的起源进化有重要的意义。但山茶属植物的核型,组间差异不大,种间(组内)关系复杂。不同的物种具有相似的核型,同一物种的不同类群又具有不同的核型,甚至同一作者对同一种的不同个体(如组培苗)所作的研究结果也有一定差异^[32]。在许多种中,核型存在杂合性和多态性,即一个种的核型有多个细胞型^[25]。这给茶组核型的研究带来许多困难。

4 生物化学水平的演化

茶树生化成分是在不同的基因调控下的代谢产物,是遗传特性的具体表现之一。茶树生命体的特异性,最突出的表现是在其次生代谢及其产物上,主要有茶多酚、咖啡碱、茶氨酸、芳香物质等,它们使得从化学角度研究茶树种质资源成为可能。

4.1 儿茶素

在儿茶素方面,前苏联的杰姆哈捷^[1]认为,原始型茶树的儿茶素组成中简单儿茶素占多数,而进化型茶树中复杂儿茶素比例较高。

4.2 氨基酸

植物体内“氨基酸库”能够协调维持植物正常的

生命活动,是植物进化和适应性的结果。茶氨酸是一种特征氨基酸,比其他氨基酸更能反映茶树演化的趋势。据唐和平和陈兴琰^[31]对9个茶树品种以及红山茶、白山茶2个对照种进行氨基酸组成分析表明,氨基酸总量和茶氨酸含量随茶树进化层次提高呈累积趋势;苯丙氨酸随茶树进化层次提高呈下降趋势。认为随着茶树的进化,树型由大变小,适应弱光照;另外,野生茶树迁移和栽培后,环境压力减轻,体内莽草酸途径的代谢活动减弱,因而苯丙氨酸和多酚类含量下降,氨基酸含量增多。

4.3 萜烯醇类

茶叶挥发性成分中的萜烯醇类化合物具有生物合成的遗传特性。竹尾忠一^[34]、游小清和李名君^[35]通过萜烯指数(TI)指标来探讨茶树分类,游小清和李名君对13个省114份种质资源的TI研究后发现,云南50份乔木或小乔木大叶类资源的TI在0.62~0.91之间;广东、广西大叶类的TI分布范围较广、变异大,但比云南的要小些;四川资源在0.32~0.67之间;而贵州、江西、安徽等省份的均小于0.4,最低到0.14。并据此推测茶树在中国有4条传播途径:第一条从云南经广西、广东、福建到浙江(沿海路传播);第二条从云南经四川,再到陕西;第三条从云南沿长江,自四川、湖北传到安徽、江苏(沿江传播);第四条从云南经四川到贵州、湖南进入江西、浙江。

4.4 同工酶

蛋白质,特别是同工酶作为基因表达的直接产物,在1980年前后有许多有关用同工酶技术研究茶树起源、分析亲缘关系、作为品种标记与分类特征报道^[36-39],而利用同工酶探讨茶树演化的则不多。

彭英^[40]用数值分类方法分析张宏达分类系统中的6个种的酯酶、多酚氧化酶、过氧化物酶同工酶酶谱,证明茶树是由五室茶系向三室茶系演化的。鲁成银等^[41]对103份茶树种质资源成熟叶片的酯酶同工酶进行分析,发现栽培型茶树的酶带比野生型的丰富;且茶树酯酶同工酶存在基本谱带,平均的谱带数呈现出小叶种>中叶种>大叶种、灌木>小乔木>乔木型茶树的趋势,聚类结果发现中叶种与小叶种的亲缘关系较近,而大叶种之间的亲缘关系较为复杂,有的较近,有的较远。Chen等^[42]系统分析了云南87份茶树资源10个同工酶的14个位点,有9个位点在所选材料中均表现出多态性,发现大理茶和阿萨姆茶的相似系数极高,而厚轴茶与茶变种、阿萨姆茶、大理茶及德宏茶的遗传距离相对较远,该结果同其形态学和生物化学的结果一致,认为同工酶技术是研究茶树分化的有效手段。

5 分子水平的演化

分子标记已成为目前植物遗传改良研究中强有力的工具。与形态学和同工酶标记相比,分子标记具有明显的优越性:它是DNA水平上遗传变异的直接反应,不受个体发育时期和环境条件的影响,可以稳定遗传;大多数分子标记呈共显性遗传,有利于隐性农艺性状的选择;基因组变异丰富,分子标记的数目几乎是无限的。目前,国家种质杭州茶树圃和渤海茶树分圃共保存了2665份茶树资源^[43],存在丰富的遗传多样性。利用传统的形态和农艺性状相结合考察这么多茶树的遗传变异和进化关系比较困难,而分子标记是研究茶树遗传多样性和遗传演化的有效工具。目前,多种分子标记,如RAPD(Random amplified polymorphic DNA)、RFLP(Restriction fragment length polymorphism)、ISSR(Inter-simple sequence repeat)、SSR等已广泛应用于该领域研究^[44-45]。

5.1 山茶属组间演化研究

Wachira等^[46]对山茶属4亚属8组28个种的植株进行RAPD分析,揭示了山茶属植物组间水平上的遗传演化关系:古茶组(Sect. *Archecamellia*)→糙果茶组(Sect. *Furfuracea*)→油茶组(Sect. *Oleifera*)→短柱茶组(Sect. *Paracamellia*)→山茶组(Sect. *Camellia*)→毛蕊茶组(Sect. *Cameliopsis*)→连蕊茶组(Sect. *Theopsis*)→茶组(Sect. *Thea*)。即茶组的遗传距离最接近连蕊茶组,而与古茶组的遗传距离最远,因此古茶组可能是茶组最原始的祖先。该结果在一定程度上证实了茶组植物由原始山茶亚属的古茶组进化而来的推断^[41]。

5.2 茶组种间演化研究

Wachira等^[47]应用27个随机引物对38个无性系进行RAPD标记,得到253条DNA谱带,其中可再现的多态性谱带有157条,并据此将38个无性系分为茶(*C. sinensis*)、阿萨姆茶(*C. assamica*)和尖萼茶(*C. assamica* ssp. *lasiocalyx*)3个类群,与既存茶树分类系统基本吻合。另外,中国茶的变异要比柬埔寨尖萼茶和印度普洱茶内的变异要大;茶与尖萼茶之间的遗传变异也更大些。而类群内存在70%的变异,类群间的变异仅有30%。许多研究均发现了茶树类群内变异远大于类群间变异的现象^[48-51]。

陈亮等^[52]对茶组植物的24个种和变种进行了RAPD分析,聚类分析的结果与茶组植物形态学分类系统基本吻合。另外,据其应用RAPD对15份茶树优异种质的遗传多态性及亲缘分析,发现中国茶树资源具有更高的遗传多态性和更复杂的遗传背景,这也从DNA层面佐证了中国是茶树的原产地和起源中心^[53]。

5.3 茶树品种间演化研究

Lee 等^[54]对韩国野生茶和日本的绿茶栽培品种的 RAPD 分析, 认为韩国的茶树部分源自中国, 部分源自日本。Matsumoto 等^[55]对韩国和日本茶树的 RFLP 分析也认为韩国的茶树部分源自日本。Matsumoto 等^[51]采用 RFLP 标记对日本绿茶栽培品种的演化进行研究, 认为日本茶树起源于中国。Kaundun 和 Matsumoto^[56]又采用 CAPS 标记进行研究, 得到同样的结果。Matsumoto^[57]采用 RFLP 分子标记研究, 将日本的绿茶栽培品种的基因型分为 5 类, 并应用 PAL DNA 分子标记研究了日本的绿茶栽培品种遗传演化关系, 比较了日本和韩国种质资源的 DNA 多样性, 认为, 日本部分的群体种来自中国, 然后从这部分群体种演化出日本现在的品种, 藪北种就是其中的主要品种。

Paul 等^[48]应用 AFLP 分子标记对印度与肯尼亚茶树种群的遗传多样性和遗传变异的研究表明, 变异的 79% 来自种群内, 21% 来自种群间, 中国类型在 PCO (Principal Coordinate) 分析中更加弥散, 反映出的遗传变异最大, 并认为肯尼亚茶树源自印度。Wachira 等对茶树种质资源的 AFLP 与 RAPD 分析也证实了肯尼亚茶树来自印度^[50]。

Katoh 等^[58]对 cpDNA 中的 rRNA 成熟酶的核酸序列进行分析, 以比较印度、孟加拉、缅甸、泰国、老挝、越南、中国和日本的栽培茶树的遗传差异, 通过比较分析, 将所研究的茶树分成 10 种不同类型并聚为 3 大族群, 其中, 印度、孟加拉、中国东部、日本和南亚地区的栽培茶树归为一类, 为茶类群; 缅甸和中国南部的本地品种与大理茶 *C. taliensis* 和滇缅茶有遗传相似性; 泰国和越南的本地品种在形态学分类上比较一致。

6 SSR 在植物遗传演化研究中的应用及其在茶树演化研究中的应用前景

SSR 作为第二代基于 PCR 的一种新型 DNA 分子遗传标记, 具有以下主要特点: 数量极为丰富, 而且分布于整个基因组; 多态性高, 等位位点多, 因此信息含量极为丰富; 以孟德尔方式呈共显性遗传; 实验操作简单, 可直接用 PCR 进行分析, 而且对 DNA 的数量要求少且质量要求也不高。因此在棉花、水稻、小麦、大豆等作物得到广泛应用^[59]。SSR 分来自于基因组和 EST (Expressed Sequence Tag) 等两类, 基于基因组的 SSR 在茶树中的应用不多^[60-62], 而 EST-SSR 的应用也刚开始^[63-65], 还有 SSR 开发的报道^[66]。

6.1 SSR 在植物遗传演化研究中的应用

Peakall 等^[67]考察 31 个大豆 SSR 位点在野生同属植物和其他豆属植物中的同源性, 发现高达 65% 的引

物扩增出产物, 这些扩增片段与栽培大豆相比较短, 也出现断裂情况。根据这些特性, 深入研究其位点特性, 有助于阐明种的进化问题。中国农业科学院种质资源研究所用 SSR 方法佐证了山西是中国大豆发源地之一的结论^[68]; SSR 分子标记虽然存在后代位点偏离问题, 但根据 SSR 位点在大豆重组自交系 F8 代群体中偏离情况研究, 对大豆微卫星在经过多次减数分裂后的稳定性分析后认为, 其等位基因差异分析仍有可能用于确定不同起源大豆之间的相互关系^[69]。

吴晓雷等^[70]用分子标记研究了大豆属种间的亲缘进化关系, 构建了大豆属 11 个种的遗传进化关系。Nagaraju 等^[71]利用 70 个 SSR 标记和 481 个 ISSR 标记对 24 个不同的水稻材料进行了进化和分类研究。Gao 和 Hideki^[72]利用 SSR 研究了水稻的两个亚种的演化关系, 认为它们来自同一个古代群体, 且彼此间存在基因漂移。

6.2 SSR 在茶树遗传演化研究中的应用现状及展望

目前, SSR 在茶树中的应用多局限于评价茶树资源的遗传多样性和亲缘关系分析。Zhao 等^[63]利用来自茶组 5 种 2 变种的 40 份资源检验新合成的 31 对引物的多态性, 结果 24 对引物表现出多态性, 表明这 24 对引物适用于茶树种质资源遗传多样性及亲缘关系研究。Hung 等^[66]研究也证明了 SSR 在茶树遗传多样性等方面应用的可行性。金基强等^[64]采用 16 对 EST-SSR 引物对 42 份茶树品种资源进行了分析, 认为利用 EST-SSR 标记进行茶树资源评价是有效的。

而 SSR 在茶树遗传分化方面的研究不多。刘振等^[65]采用 31 对 EST-SSR 引物, 对 60 份西南茶区茶树资源进行了遗传多样性和亲缘关系分析, 结果表明, 西南茶区茶树资源的遗传多样性非常丰富; UPGMA 聚类表明, 按相似系数为 0.39 可将参试的 60 份种质资源分为五大类, 并发现大部分资源因地域来源相同或遗传背景相似而聚在同一类群中。Ohsako 等^[62]采用 6 对 SSR 引物对日本京都当地的 8 个群体种茶树的遗传关系进行研究, 将 8 个群体种分为 2 大族群, 该分类与其实际的地理分布相符, 并发现这些群体彼此间存在明显的分化, 认为任何一个单独的群体都不能代表京都地区茶树的全部遗传变异, 在构建当地茶树种质资源圃时, 为了最大化遗传多样性, 应该收集尽可能多的群体。

鉴于 EST-SSR 的操作相对简单, 且 EST-SSR 标记技术较成熟, 且具有共显性等优点, 借鉴其他作物中采用 SSR 分析演化关系的成功经验以及在茶树研究中已有的基础, 将该技术用于分析茶树的遗传演化关系具有广泛的前景。

参考文献

- [1] 杰姆哈捷 K E. 论茶树原产地问题. 刘祖生. 译. 茶叶译丛(生物化学), 上海: 上海科技编译馆, 1963.
- [2] 虞富莲. 论茶树原产地和起源中心. 茶叶科学, 1986, 6(1): 1-8.
- [3] Hashimoto M, Takasi S. Morphological studies on the origin of tea plant V: A proposal of one place of origin by cluster analysis. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 1978, 21(2): 93-101.
- [4] Hashimoto M. The origin of the tea plant. Japan Agricultural Research Quarterly, 1985, 19(1): 40-43.
- [5] Takeo T, You X Q, Wang H F, et al. One speculation on the origin and dispersion of tea plant in China--One speculation based on the chemotaxonomy by using the contest-ration of terpen-alcohols found in the tea aroma composition. Journal of Tea Science, 1992, 12(2): 81-86.
- [6] 陈亮, 虞富莲, 杨亚军. 茶树种质资源与遗传改良. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006: 11-40.
- [7] Sealy, J R. A revision of the genus *Camellia*. Royal Horticultural Society, London, 1958.
- [8] 张宏达. 茶树的系统分类. 中山大学学报: 自然科学版, 1981, (1): 87-99.
- [9] 张宏达. 茶叶植物资源的修订. 中山大学学报: 自然科学版, 1984, (1): 1-12.
- [10] 张宏达. 中国山茶科植物新种. 中山大学学报: 自然科学版, 1990, 29(2): 85-93.
- [11] 闵天禄. 山茶属茶组植物的订正. 云南植物研究, 1992, 14(2): 115-132.
- [12] Min T L, Bartholomew B. Theaceae. //Z-Y. Wu & P. H. Raven (editors), Flora of China, Vol. 12. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis., 2007.
- [13] 陈亮. 茶组植物系统分类学研究现状. 茶叶, 1996, 22(2): 16-19.
- [14] 陈亮, 虞富莲, 童启庆. 关于茶组植物分类与演化的讨论. 茶叶科学, 2000, 20(2): 89-94.
- [15] 闵天禄, 张文驹. 山茶属植物的进化与分布. 云南植物研究, 1996: 18(1): 1-13.
- [16] 陈亮. 茶组植物的分子系统学研究—遗传多样性与分类. 杭州: 浙江大学, 2002b.
- [17] Baranova M. Principles of comparative stomato graphic studies of flowering plants. Botanical Review, 1992, 58(1): 49-100.
- [18] Scatena V L, Giulietti A M, Borba E L, et al. Anatomy of Brazilian Eriocaulaceae: correlation with taxonomy and habitat using multivariate analyses. Plant Systematics and Evolution. 2005, 253: 1-22.
- [19] Yang Z R, Lin Q. Comparative morphology of the leaf epidermis in Schisandra (Schisandraceae). Botanical Journal of the Linnean Society. 2005, 148: 39-56.
- [20] 严学成. 茶树形态结构与品质鉴定. 北京: 农业出版社, 1990: 100-110.
- [21] 束际林. 茶树种质资源叶肉结构及花粉形态的鉴定与演化. 中国农业科学院茶叶研究所编. 茶叶科学研究论文集(1991), 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 62-69.
- [22] 束际林, 陈亮. 茶树花粉形态的演化趋势. 茶叶科学, 1996, 16(2): 115-118.
- [23] 贝克 C B. 被子植物的起源和早期演化. 张芝玉. 译. 北京: 科学出版社, 1981: 157-194.
- [24] 陈亮, 童启庆, 高其康, 等. 山茶属 8 种 1 变种花粉形态比较. 茶叶科学, 1997, 17(2): 183-188.
- [25] 李光涛, 梁涛. 中国山茶属 4 种 2 变种的核型研究. 广西植物, 1990, 10(3): 187-197.
- [26] 李光涛. 茶树的核型及种的分类研究. 茶叶, 1983, (4): 11-16.
- [27] 李懋学, 严学成. 中国某些野生和栽培茶的核型研究. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 319-321.
- [28] 李斌, 陈兴琰, 陈国本, 等. 茶树染色体组型分析. 茶叶科学, 1986, 6(2): 7-14.
- [29] 李斌. 广东南昆山毛叶茶染色体组型分析. 中国茶叶, 1995, 5: 30-31.
- [30] 李斌, 陈国本, 郑永球. 邦威大茶树等 5 个大叶茶的染色体组型分析. 茶叶科学, 1996, 16(2): 119-124.
- [31] 梁国鲁, 周才琼, 林蒙嘉, 等. 贵州大树茶核型变异和进化. 植物分类学报. 1994, 32(4): 308-315.
- [32] 李光涛, 梁涛, 张梅莉. 五种山茶属植物的核型研究. 茶叶, 2001, 27(2): 17-21.
- [33] 唐和平, 陈兴琰. 茶树品种资源氨基酸组成与亲缘关系的研究. 湖南农学院学报, 1995, 21(2): 126-129.
- [34] 竹尾忠一. 茶芽のモノテルペンアルユール组成にみられる品种特性. 农芸化学会志, 1982, (56): 455.
- [35] 游小清, 李名君. 茶树种质资源萜烯指数分析. //中国农业科学院茶叶研究所编. 茶叶科学研究论文集(1991). 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 140-146.
- [36] 谭淑宜, 朱尚同, 龚范武. 利用同工酶技术对江华苦茶等五个茶树品种亲缘关系的研究初报. 湖南农学院学报, 1983, (2): 63-66.
- [37] 龚景文, 陈兴琰, 陈国本. 湖南主要茶树资源的同工酶研究. 湖南农学院学报, 1989, 15(1): 51-60.
- [38] 谷博司. 根据同工酶进行品种分类的可能性. 陈荣冰. 译. 茶叶科学简报, 1989, 124(3): 36.
- [39] 叶乃兴, 黄福平. 茶树花器酯酶同工酶的研究. 中国茶叶, 1996, (5): 18-19.
- [40] 彭英. 茶组 6 个种同工酶、可溶性蛋白质亚基及数值分类研究 [D]. 长沙: 湖南农学院, 1990.
- [41] 鲁成银, 李名君, 刘维华. 茶酯酶同工酶的研究. 茶叶科学研究论文集(1991). 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 132-139.
- [42] Chen J, Wang P S, Xia Y M, et al. Genetic diversity and differentiation of *Camellia sinensis* L. (cultivated tea) and its wild relatives in Yunnan province of China, revealed by morphology, biochemistry and allozyme studies. Genetic Resources and Crop Evolution, 2005, 52: 41-52.
- [43] 陈亮, 杨亚军, 虞富莲. 中国茶树种质资源研究的主要进展和展望. 植物遗传资源学报, 2004a, 5(4): 389-392.
- [44] Chen L, Yao M Z, Zhao L P, et al. Recent research progresses on molecular biology of tea plant (*Camellia sinensis*). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and topical issues. London: Global Science Books, 2006, 4: 425-436.
- [45] Ni S, Yao M Z, Chen L, et al. Germplasm and breeding research of tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, based on DNA molecu-

- lar marker approaches. *Frontiers of Agriculture in China*. 2008, 2 (2): 200-207.
- [46] Wachira F N, Powell, Waugh R. An assessment of genetic diversity among (*Camellia sinensis* L. (cultivated tea) and its wild relatives based on RAPD and organelle-specific STS. *Heredity*, 1997, 78: 603-611.
- [47] Wachira F N, Wash R, Haekett C A, et al. Ditection of genetic diversity in tea(*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 1995, 38: 201- 210.
- [48] Paul S, Wachira F N, Powell W, et al. Diversity and genetic differentiation among population of Indian and Kenyan tea *Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze, revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94: 255-263.
- [49] Kaundun S S, Zhyvoloup A, Park Y G. Evaluation of genetic diversity among elite tea (*Camellia. sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica*. 2000, 115: 7-16.
- [50] Wachira F N Tanaka J, Takeda Y. Genetic variation and differentiation in tea (*Camellia sinensis*) germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2001, 76(5): 557-563.
- [51] Matsumoto S, Kiriwa Y, Takeda Y. Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 998-1002.
- [52] 陈亮, 山口聪, 王平盛, 等. 利用 RAPD 进行茶组植物遗传多样性和分子系统学分析. *茶叶科学*, 2002a, 22(1): 19-24.
- [53] 陈亮, 杨亚军, 虞富莲. 应用 RAPD 标记进行茶树优异种质遗传多态性、亲缘关系分析与分子鉴别. *分子植物育种*, 2004b, 2(3): 385-390.
- [54] Lee S H, Choi H S, Kim R H, et al. Identification of Korean wild tea plants and Japanese green tea cultivars using RAPD markers. *Journal of the Korean Tea Society*, 1995, 1(1): 129-148.
- [55] Matsumoto S, Kiriwa Y, Yamaguchi S. The Korean tea plant (*Camellia sinensis*): RFLP analysis of genetic diversity and relationship of Japanese tea. *Breeding Science*, 2004, 54: 231-237.
- [56] Kaundun S S, Matsumoto S. Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 1765-1770.
- [57] Matsumoto S. Studies on Differentiation of Japanese tea cultivars (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) according to the genetic diversity of Phenylalanine Ammonia-Lyase. *野菜茶叶研究所研究报告*, 2006, 5: 63-111.
- [58] Katoh Y, Katoh M, Takeda Y, et al. Genetic diversity within cultivated teas based on nucleotide sequence comparison of ribosomal RNA maturase in chloroplast DNA. *Euphytica*, 2003, 134: 287-295.
- [59] 王彪, 邱丽娟. 大豆 SSR 技术研究进展. *植物学通报*, 2002, 19(1): 44-48.
- [60] Kaundun S S, Matsumoto S. Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome* 2002, 45, 1041-1048.
- [61] Freeman S, West J, James C, et al. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea (*Camellia sinensis*), *Molecular Ecology Notes*, 2004,4(3):324-326.
- [62] Ohsako T, Ohgushi T, Motosugi H, et al. Microsatellite variability within and among local landrace populations of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, in Kyoto, Japan. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2008, 55:1047-1053.
- [63] Zhao L P, Liu Z, Chen L, et al. Generation and characterization of 24 novel EST derived microsatellites from tea plant (*Camellia sinensis*) and cross-species amplification in its closely related species and varieties. *Conservation Genetics*, 2008, 9:1327-1331.
- [64] 金基强, 崔海瑞, 龚晓春, 等. 用 EST-SSR 标记对茶树种质资源的研究. *遗传*, 2007, 29(1): 103-108.
- [65] 刘振, 王新超, 赵丽萍, 等. 基于 EST-SSR 的西南茶区茶树资源遗传多样性和亲缘关系分析. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 100-110.
- [66] Hung C Y, Wang K H, Huang C C, et al. Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from *Camellia sinensis* in Taiwan using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Conservation Genetics*, 2008, 9: 779-781.
- [67] Peakall R, Gilmore S, Keys W, et al. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume gena, implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15(10): 1275-1287
- [68] 许占友, 邱丽娟, 常汝镇, 等. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质. *中国农业科学*, 1999,32(增刊): 40-48.
- [69] 刘峰, 东方阳, 邹继军, 等. 应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传变异性分析. *遗传学报*, 2000, 27(7): 628-633.
- [70] 吴晓雷, 贺超英, 陈受宜, 等. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘进化关系. *遗传学报*, 2001, 28(4): 359-366.
- [71] Nagaraju J, Kathirvel M, Kumar R R, et al. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(9): 5836-5841.
- [72] Gao L Z, Innan H. Non independent domestication of the two rice subspecies, *Oryza sativa* ssp. *indica* and ssp. *japonica*, demonstrated by multi-locus micro-satellites. *Genetics*, 2008, 179: 965-976.