

· 研究报告 ·

## 利用荧光标记SSR鉴别21个茶花新品种

陶乃奇<sup>1</sup>, 张斌<sup>2,3</sup>, 刘信凯<sup>4</sup>, 周和达<sup>2</sup>, 钟乃盛<sup>4</sup>, 严丹峰<sup>4</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 高继银<sup>4</sup>, 张文驹<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>复旦大学生命科学学院生物多样性科学研究所, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433; <sup>2</sup>上海星源农业实验场, 上海 201417; <sup>3</sup>上海市农业发展促进中心, 上海 200335; <sup>4</sup>棕榈生态城镇发展股份有限公司, 广州 510627

**摘要** 利用杜鹃红山茶(*Camellia azalea*)转录组数据和前人研究中获得的12个高多态性的SSR位点, 采用荧光毛细管电泳分析了21个茶花杂交新品种的基因型。结果显示, 12对SSR引物都能获得稳定清晰的扩增产物, 且上述12个SSR位点的基因型能够完全区分上述21个茶花新品种。其中, 来自同一杂交组合后代的多个品种, 基因型间有差异的位点数为2–10个, 来自不同杂交组合后代的品种间, 其基因型有差异的位点数为5–12个。研究结果表明, 上述21个茶花新品种均获得了独特的基因型标记, 能准确地进行品种身份鉴定, 这对以扦插或嫁接扩大生产的茶花品种的鉴定和品种权保护具有重要意义。

**关键词** 山茶属, 荧光标记SSR, 新品种保护, 品种鉴定

陶乃奇, 张斌, 刘信凯, 周和达, 钟乃盛, 严丹峰, 张敏, 高继银, 张文驹 (2019). 利用荧光标记SSR鉴别21个茶花新品种. 植物学报 54, 37–45.

山茶属(*Camellia*)是山茶科(Theaceae)中种类较多的一个属, 该属包括许多世界闻名的观赏茶花种质资源, 历来备受世界花卉界关注和青睐(闵天禄, 2000)。随着杂交育种技术的快速发展与无性繁殖技术的不断进步, 茶花新品种大量涌现。目前, 世界茶花品种已达3万余种, 我国在国际登陆注册茶花新品种108个(李艳梅, 2016; 张亚利等, 2016)。此外, 山茶属被列入我国第一批林业新品种保护名录(中国国家林业局, 2000), 目前已获得品种权保护的茶花新品种有68个, 在所有林业植物新品种权申请获批名录中, 来自该属的品种数量位居第三。由此可见, 茶花品种的培育受到国家和育种者的高度重视。

茶花作为观赏花卉, 可为育种者和生产者带来可观的经济利益。故经常出现盗取或冒充茶花品种情况, 这严重侵犯了育种者和生产者的合法权益。因此, 能否有效鉴定和区分不同品种并对其进行品种权保护是维护育种者与生产者合法权益亟待解决的问题。鉴于茶花新品种数量很多, 且新品种是由少数几个山茶物种或栽培品种培育获得, 故部分品种间的性状差异较小, 遗传背景相似, 这使得茶花新品种的鉴定和区分较为困难。

现行的茶花品种分类及鉴定方法包括DUS (Distinctness, Uniformity, Stability) 鉴定法 (Bartholomew, 1980; Wendel and Parks, 1983; 张晓庆, 2008)和分子标记法(申屠文月等, 2006; 张景荣和刘军, 2006; Xu et al., 2009)。DUS鉴定法成本高、周期长且易受环境和人为因素影响, 故在品种鉴定中的使用受到较多限制(李汝玉等, 2007)。目前, 常用的为分子标记技术。在众多的分子标记中, 荧光标记SSR因能准确获得目标DNA片段的大小(精确至1 bp), 检测结果稳定、准确且高效, 并适用于大批量品种的检测分析, 被广泛应用于各类作物(如野生稻(*Oryza rufipogon*) (陈雨等, 2008)、百合属(*Lilium*) (徐雷锋等, 2014)、牡丹(*Paeonia suffruticosa*) (郭琪等, 2015)和芍药(*P. lactiflora*) (张嘉等, 2016)等)的遗传结构分析、品种鉴定、分子身份证构建及品种权保护等方面的研究。山茶属植物中, 关于SSR分子标记的研究主要集中于金花茶(*C. nitidissima*) (Xu et al., 2009)、茶(*C. sinensis*) (段云裳等, 2011)、华东山茶(*C. japonica*) (胡兴华等, 2013)、张氏红山茶(*C. changii*) (李琳琳等, 2014)和油茶(*C. oleifera*) (陈赢男等, 2014; 周文才等, 2017)等物种或品种的种质资源多

收稿日期: 2018-01-18; 接受日期: 2018-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(No.31670223)和上海市农委农业种质资源创新与良种良法配套技术集成应用沪农科种字(2015)第10号(No.2016F2FC0012)

\* 通讯作者。E-mail: wjzhang@fudan.edu.cn

样性、SSR指纹图谱构建和杂交品种鉴定等方面。观赏性茶花品种的研究中, SSR分子标记的开发和使用也变得越来越普遍(Chen et al., 2010; Liufu et al., 2014; 邵阳等, 2015; 张亚利等, 2016)。但利用荧光标记SSR对茶花品种鉴定及品种权保护仍缺乏相对统一的方法体系, 给茶花品种鉴定及保护带来困难。因此构建一套统一的鉴定体系来完成茶花品种鉴定与保护势在必行。基于此, 本研究以一批观赏性茶花杂交新品种为材料, 利用荧光标记SSR对其进行品种标定, 为每个品种构建唯一的分子身份证, 以为其品种权保护提供相关遗传信息。

1 材料与方法

1.1 样品材料

本研究所用的21个茶花新品种材料来自11个亲本品种(Var.A–Var.K)的10个杂交组合(ZH-01–ZH-10, 表1)。所有品种的亲本中都包含品种A。其中, 品种SJ-01–SJ-13均以品种A为父本, SJ-01–SJ-04来自杂交组合ZH-01, SJ-05–SJ-08来自杂交组合ZH-02, SJ-09–SJ-11来自杂交组合ZH-03; 品种SJ-14–SJ-21均以品种A为母本, SJ-14–SJ-16来自杂交组合ZH-06, SJ-17–S-18来自杂交组合ZH-07; 其余材料分别来自其它不同的杂交组合。所用材料采自广东棕榈生态城镇发展股份有限公司和上海茶花园, 由其亲本杂交形成新品种后, 再以嫁接方式进行快速繁殖, 详细方法参见高继银等(2016)的专著。所采集的研究材料均来自杂交形成的植株, 选取无病害植株的幼嫩叶片, 液氮速冻后于–80℃保存备用。

1.2 DNA提取及引物筛选

所有样品均采用改良的CTAB法(Doyle and Doyle, 1987)提取总DNA, 并用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量。之后, 使用NanoDrop ND-1000检测各样品总DNA浓度, 并全部稀释至10 ng·μL<sup>-1</sup>备用。

SSR引物的获得方式有2种, 3对从前人的研究中获得(Kaundun and Matusmoto, 2002; Freeman, 2004; 刘振等, 2008); 9对从本实验室所用的杜鹃红山茶(*Camellia azalea* Wei)的转录组数据中开发获得(表2)。从每个杂交组合中各挑取1个杂交新品种进行引物筛选实验。初步挑选出60对引物, 由上海桑尼生

表1 21个山茶杂交新品种信息  
Table 1 Information of 21 new *Camellia* hybrid varieties in this study

Cross combination No.	New variety No.	Parental types of cross combinations
ZH-01	SJ-01	Var. B (♀)×Var. A (♂)
	SJ-02	Var. B (♀)×Var. A (♂)
	SJ-03	Var. B (♀)×Var. A (♂)
	SJ-04	Var. B (♀)×Var. A (♂)
ZH-02	SJ-05	Var. C (♀)×Var. A (♂)
	SJ-06	Var. C (♀)×Var. A (♂)
	SJ-07	Var. C (♀)×Var. A (♂)
	SJ-08	Var. C (♀)×Var. A (♂)
ZH-03	SJ-09	Var. D (♀)×Var. A (♂)
	SJ-10	Var. D (♀)×Var. A (♂)
	SJ-11	Var. D (♀)×Var. A (♂)
ZH-04	SJ-12	Var. E (♀)×Var. A (♂)
ZH-05	SJ-13	Var. F (♀)×Var. A (♂)
ZH-06	SJ-14	Var. A (♀)×Var. G (♂)
	SJ-15	Var. A (♀)×Var. G (♂)
	SJ-16	Var. A (♀)×Var. G (♂)
ZH-07	SJ-17	Var. A (♀)×Var. H (♂)
	SJ-18	Var. A (♀)×Var. H (♂)
ZH-08	SJ-19	Var. A (♀)×Var. I (♂)
ZH-09	SJ-20	Var. A (♀)×Var. J (♂)
ZH-10	SJ-21	Var. A (♀)×Var. K (♂)

物科技有限公司合成; 并用1%的琼脂糖凝胶电泳和8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行筛选。PCR反应体系10 μL, 包括6.15 μL 3dH<sub>2</sub>O、1.0 μL 10×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free)、0.8 μL Mg<sup>2+</sup> (25 mmol·L<sup>-1</sup>)、0.6 μL dNTP (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)、正向和反向引物各0.4 μL、0.15 μL Taq酶(5 U·μL<sup>-1</sup>)和0.5 μL DNA模板。PCR反应程序为: 94℃预变性3分钟; 94℃变性30秒, 各引物退火温度退火30秒, 72℃延伸1分钟, 30个循环; 72℃延伸10分钟, 4℃保存。先用1%的琼脂糖凝胶电泳检测各引物的扩增效率, 然后用8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR产物多态性。各引物对扩增产物的上样量为1.5 μL, 分子量标准为50 bp DNA Ladder, 180 V电压下电泳2小时, 0.1% AgNO<sub>3</sub>染色15分钟, NaOH显色, 拍照保存以备分析。将挑出的60对引物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选, 获得12对条带清晰、多态性和稳定性高的引物, 用于后续荧光毛细管电泳(表2)。

1.3 荧光标记SSR毛细管电泳

在筛选出的12对引物的正向引物的5'端加上M13接

表2 12对SSR引物信息

Table 2 Information of 12 primer pairs in this study

No.	Primer sequences (5'-3')	Repeat motifs	Ta (°C)	References
478	F: CAACACCACCAACAAGA R: GATATGAGATCCGTCCC	(AAAGG)4	53	Liu et al., 2008
SSR2	F: TATTGCCTACGACCATTTCCA R: TTTGAGTTCGTTGCCTTCTCT	(GA)14	56	Kaundun and Matsumoto, 2002
CamsinM11	F: GCATCATTCACCACTCACC R: GTCATCAAACCAAGTGGCTCA	(CA)12	60	Freeman et al., 2004
CamSSR01	F: CCAACAAGAATCAGGAAGAG R: ATCCAACGGTGGTAGACGAG	(AAT)6	54	In this study
CamSSR02	F: AGTTCCGCCTCCAGTTTGAC R: GGACCGAGAGGTAACAGTGG	(ACG)7	54	In this study
CamSSR03	F: GCCACTACCCTCTTTACACC R: TTCTCTTCCTCTTTCTTCCC	(CAC)7	55	In this study
CamSSR04	F: ATGTGTTGAGTAGCGAGCGT R: TTGTCCATCTTTATGTAGGG	(AT)10	56	In this study
CamSSR05	F: GCAAACACCAACTGATTACC R: TTCCATACAACCAACCAAA	(TA)10	56	In this study
CamSSR06	F: GGTTTGGAAAAAGGACACGC R: AATCTGCCTCTGGTAGTCCG	(GCC)7	58	In this study
CamSSR07	F: TCTCATCCCCATCTTTATCC R: GTTCCCTGCTGCTGTTGTTA	(TCC)7	58	In this study
CamSSR08	F: TCACCAAGTCACTTTCCTCC R: CCACCAAAAGGCACAATACC	(AC)10	58	In this study
CamSSR09	F: CATCATCCATCAAACCGTCC R: GAAGGCACATTGGTTCTGGG	(AT)10	58	In this study

F: 正向引物; R: 反向引物 F: Forward primer; R: Reverse primer

头序列(5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), 使其能与荧光标记M13结合, 反向引物不变。毛细管电泳的PCR扩增体系为10 μL: 6.15 μL 3dH<sub>2</sub>O、1.0 μL 10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free)、0.6 μL Mg<sup>2+</sup> (25 mmol·L<sup>-1</sup>)、0.8 μL dNTP (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)、0.04 μL带M13的正向引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)、0.36 μL M13 荧光标记 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)、0.4 μL反向引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)、0.15 μL Taq酶(5 U·μL<sup>-1</sup>)和0.5 μL DNA模板。其中, 用于本研究的M13荧光标记有ROX (红色)、JOE (绿色)和FAM (蓝色) 3种。PCR反应程序为: 94°C预变性3分钟; 94°C变性30秒, 各退火温度退火30秒, 72°C延伸1分钟, 30个循环; 72°C延伸10分钟, 4°C保存。将获得的PCR产物交由上海迈普生物科技有限公司测序, 用Gene Marker 2.2.0软件读取数据。

1.4 数据统计分析与分子身份证构建

将获取的数据输入Excel表格, 通过GenALEx 6.2进

行数据格式转换。使用POPGENE v1.32软件(Yeh et al., 1999)计算等位基因数目(Na)和有效等位基因数(Ne)。多态性信息含量PIC值(Polymorphism information content)参考Nei (1973)的方法计算, 公式为  $PIC=1-\sum P_i^2$  ( $P_i$ 表示第*i*个等位位点出现的频率, 反映每个SSR位点的多态性水平)。本研究参考徐雷锋等(2014)的方法构建21个茶花新品种的分子身份证。即将获得的荧光SSR多态性数据转换为数字或字母编码来表示各品种的分子身份证。按照每对引物在某个品种扩增出的每种基因型给予1、2、3、.....、9的赋值。为避免出现两位数字, 当基因型数大于9时, 分别用A、B和C代表第10、11和12种基因型, 以此类推。引物所在位点在分子身份证中的位置由引物扩增出的基因型数目从多到少顺序决定, 将各引物赋值后的数字或字母串联构成1个拥有12个数字或字母的字符串作为样品的分子身份证。另外, 由于各引物在不同品种间扩增出的基因型存在差异, 故对这21个新品

种间的差异位点数进行统计，以此来比较不同杂交组合后代形成的新品种间的差异。

2 结果与讨论

2.1 引物筛选结果与多态性分析

利用筛选出的12对引物对21个茶花新品种的总DNA进行PCR扩增，均获得很好的效果。经荧光毛细管电泳后，每对引物在每个杂交新品种中均可获得精确的DNA片段大小(图1)。12对引物在21个样品中共扩增出59.00个等位基因，平均每对引物扩增出4.92个。其中，引物478扩增出的等位基因数目最多(7.00个)；引物CamSSR01扩增出的等位基因数目最少(3.00个)。多态性信息含量PIC值的变化范围为0.29–0.77，平均为0.55。引物CamSSR03和CamSSR08的PIC值最高为0.77；引物CamSSR01的PIC值最低为0.29。12对引物中PIC值高于0.50的有7对，属于高多态性位点，其余5对介于0.29–0.50之间，属于中度多态性位点。各引物扩增结果及多态性信息如表3所示。

2.2 山茶杂交新品种间的遗传差异性比较

12对引物在21个杂交新品种中扩增后获得的基因型种类及数目见表4。这12对引物所在位点在这些新品种中共获得71种基因型。每对引物扩增出的基因型数

表3 12个SSR位点的等位基因数和多态性信息  
Table 3 The number of alleles and polymorphism of 12 SSR loci

Primers	Na	Ne	PIC
478	7.00	4.12	0.72
SSR2	6.00	2.63	0.58
CamsinM11	4.00	1.85	0.43
CamSSR01	3.00	1.48	0.29
CamSSR02	4.00	2.97	0.62
CamSSR03	6.00	4.96	0.77
CamSSR04	6.00	2.99	0.62
CamSSR05	4.00	2.82	0.58
CamSSR06	4.00	1.76	0.41
CamSSR07	4.00	1.58	0.35
CamSSR08	6.00	4.96	0.77
CamSSR09	5.00	2.32	0.49
(mean)	4.92	2.87	0.55

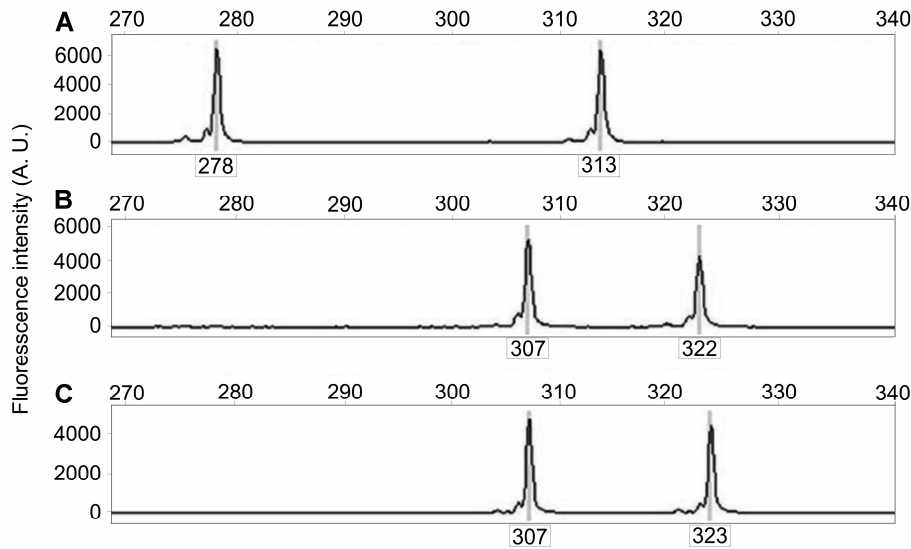


图1 3个山茶杂交新品种中荧光引物CamSSR03的SSR检测结果  
(A) SJ-02品种; (B) SJ-18品种; (C) SJ-21品种

Figure 1 SSR peak map of 3 new *Camellia* hybrid varieties by the CamSSR03 primer  
(A) Variety SJ-02; (B) Variety SJ-18; (C) Variety SJ-21



表4 12对引物所在位点的基因型赋值标准

Table 4 The encode standard of genotypes at 12 SSR loci in this study

Code of pattern	Cam-SSR08	Cam-SSR04	478	SSR2	Cam-SSR03	Cam-SSR09	Cam-SSR06	Cam-sinM11	Cam-SSR01	Cam-SSR07	Cam-SSR05	Cam-SSR02
1	125/131	165/167	113/115	217	278/313	209/215	176/185	171	188/200	206	234/240	271/274
2	125/135	165/171	113/129	217/219	278/321	211/217	179/182	173	195	206/212	234/242	271/277
3	127	167	115	217/225	278/322	213/215	179/185	177	195/200	206/215	236/240	271/283
4	127/131	167/171	115/129	217/227	278/323	215	182/185	181	200	206/221		
5	129	167/173	117/129	217/231	307/321	215/217	185					
6	129/131	169/171	121/129	217/235	307/322	217						
7	129/133	171	123/129	219/235	307/323							
8	129/135	171/173	123/133									
9	131/133	171/175										
A	133											
B	133/135											

目变化范围为3–11种。其中, 引物CamSSR08获得的基因型数目最多(11种); 引物CamSSR05和Cam-SSR02获得的基因型数目最少(3种); 其余引物获得的基因型数目介于4–9种之间。以各引物在21个杂交新品种中获得的的不同基因型为依据来区分这些茶花新品种。

各位点在21个杂交新品种之间的差异统计结果如表5所示。在所有样品中, 差异位点数的变化范围为2–12。其中, 品种SJ-01和SJ-02, SJ-14和SJ-15的差异位点数最低(2个); 品种SJ-01和SJ-03, SJ-14和SJ-16, SJ-15和SJ-16的差异位点数次之(3个)。而品种SJ-01和SJ-18, SJ-02和SJ-18, SJ-04和SJ-18, SJ-12和SJ-18之间的12对引物所在位点各不相同, 差异位点数最大值达12。通过各品种间差异位点数的比较, 可以清晰地看出, 根据这12对引物所对应的位点可以将这21个杂交新品种鉴定区分开。

2.3 山茶杂交新品种分子身份证的构建

先将12对引物扩增出的基因型赋值并排序(表4), 然后根据12对引物在21个新品种中具体扩增出的基因型获得这21个新品种的分子身份证(表6)。从表6可以看出, 每个品种都有自己独特的分子身份证编码, 可将不同品种有效区分; 在相同位置上, 编码相同表示该引物在样品上扩增得到的基因型相同。

2.4 讨论

已有研究表明, SSR分子标记技术的稳定性和准确性

高(Rongwen et al., 1995; Powell et al., 1996a, 1996b; Gianfranceschi et al., 1998; Cipriani et al., 2002; Kalia et al., 2011)。加之以荧光标记分析技术检测SSR扩增产物的方法灵敏度高, 能获得较准确的扩增产物长度(徐雷锋等, 2014; 张嘉等, 2016)。此外, 将获得的SSR数据转化为数字或字母编码作为各品种的分子身份证, 可以简洁且清晰地将不同品种区分开, 使品种比对更加高效、方便和准确。本研究基于荧光标记SSR毛细管电泳检测方法构建了21个山茶杂交新品种的分子身份证, 所用的12对引物PCR扩增效率高, 毛细管电泳获得的目的片段大小精确(图1), 等位基因数目及多态性信息含量高。通过这12对引物可准确且可靠地将21个山茶杂交新品种区分开。

荧光标记SSR在品种鉴定方面除了具备高稳定性和高准确性外, 还具有较高的有效性(李汝玉等, 2007; 陈赢男, 2014; 徐雷锋等, 2014; 张嘉等, 2016)。其不仅能将亲缘关系很远的品种鉴别开, 还能将亲缘关系很近甚至是同一杂交组合产生的不同新品种区分开(张冰清等, 2014; 陈赢男等, 2014)。本研究所鉴定的21个新品种来自11个亲本的10个杂交组合, 每个品种的亲本中都有1个品种A。其中, 品种SJ-01–SJ-04来自组合ZH-01, SJ-05–SJ-08来自组合ZH-02, SJ-09–SJ-11来自组合ZH-03, SJ-14–SJ-16来自组合ZH-06, SJ-17–SJ-18来自组合ZH-07 (表1)。虽然每个杂交组合形成的不同品种间亲缘关系较近(有的杂交组合产生的品种间只存在2个差异位点)

表5 12个SSR位点在21个山茶杂交新品种之间的差异位点数

Table 5 Numbers of discrepant loci of 12 SSR loci among 21 new <i>Camellia</i> hybrid varieties																				
	SJ-02	SJ-03	SJ-04	SJ-05	SJ-06	SJ-07	SJ-08	SJ-09	SJ-10	SJ-11	SJ-12	SJ-13	SJ-14	SJ-15	SJ-16	SJ-17	SJ-18	SJ-19	SJ-20	SJ-21
SJ-01	2	3	5	9	9	9	9	9	7	9	8	9	10	10	9	9	12	9	9	9
SJ-02		5	5	9	9	9	8	9	8	8	8	9	10	10	9	9	12	9	9	9
SJ-03			6	10	10	10	10	9	6	9	9	10	10	10	9	9	11	10	9	9
SJ-04				10	10	10	10	9	8	10	8	10	9	9	8	10	12	11	10	10
SJ-05					5	8	6	6	7	9	9	7	9	8	8	9	7	7	9	9
SJ-06						6	10	8	8	10	10	9	9	9	9	7	8	5	8	9
SJ-07							6	10	10	11	10	9	10	10	10	8	10	8	7	11
SJ-08								10	11	10	9	6	9	8	8	8	8	7	9	10
SJ-09									4	6	9	11	11	11	10	8	9	9	10	9
SJ-10										6	9	11	11	11	10	9	9	8	10	8
SJ-11											10	11	11	11	10	9	8	10	7	9
SJ-12												10	10	11	10	8	12	10	9	9
SJ-13													7	7	7	9	8	9	8	10
SJ-14														2	3	8	9	9	7	9
SJ-15															3	8	8	9	8	9
SJ-16																8	9	9	8	8
SJ-17																				
SJ-18																	8	7	8	9
SJ-19																		9	9	10
SJ-20																			10	7
SJ-21																				10

表中每个框内的数字表示来自同一杂交组合形成的新品种间的差异位点数。  
The numbers inside each triangle show the counts of discrepant loci among varieties derived from the same hybridized combination.

表6 21个山茶杂交新品种的分子身份证编码  
Table 6 Molecular identity code of 21 new *Camellia* hybrid varieties

No.	Molecular identity code	No.	Molecular identity code
SJ-01	192315514322	SJ-12	393121414432
SJ-02	291315514322	SJ-13	485225334121
SJ-03	122516514322	SJ-14	546224111121
SJ-04	897336114322	SJ-15	545254111121
SJ-05	975265414113	SJ-16	646254114121
SJ-06	913235513113	SJ-17	353661513121
SJ-07	A73135522123	SJ-18	445664323113
SJ-08	A35165424121	SJ-19	934175513111
SJ-09	973663214212	SJ-20	563424544123
SJ-10	972646514212	SJ-21	748772514411
SJ-11	B61664544212		

品种分子身份证编码根据表4的基因型赋值标准构建, 数字或字母位置由12对引物扩增出的基因型数目从多到少顺序决定(在表4第一行中, 从CamSSR08至CamSSR02), 每个位置上的数字或字母值表示该品种在该引物对获得的基因型类型。  
The molecular identity code is based on the encode standard of genotype at 12 SSR loci in table 4. The site of number or letter is determined by the order of 12 loci in table 4 (from CamSSR08 to CamSSR02 in the first row in table 4), and the value of a number or letter on each site indicates the genotype pattern obtained in the variety by primer pairs.

(表5), 但是通过12对荧光标记SSR引物所在的位点却能很好地将这21个杂交新品种标定出来, 并可根据每对引物所在的位点具体扩增出的基因型获得每个品种独特的分子身份证编码(表6)。可见, 本研究所用的12对荧光标记SSR引物对山茶新品种的鉴定较为有效。

与通过有性生殖进行繁殖的栽培品种不同, 茶花以扦插或嫁接的方式进行繁殖, 因此每个杂交新品种一旦形成后, 其无性繁殖产生的后代遗传物质将与亲本保持一致。故确定了1个品种基因型的独特性, 就能用该基因型标记1个品种, 这一特点使得用荧光标记SSR鉴定新品种更加方便、有效。本研究所用的11个亲本包括了茶花育种中最重要的4个山茶物种(*C. japonica*、*C. reticulata*、*C. sasanqua*和*C. azalea*), 说明本研究所用引物具有很高的通用性, 甚至在不同组的山茶物种内都能有效使用, 表明这些SSR位点可能还存在更多的等位基因。同时, 我们建立的识别

体系具有较大的使用范围, 不仅限于本研究所涉及的21个茶花新品种。根据12对SSR引物所在位点现已获得的等位基因数目情况, 理论上引物478会产生28种基因型, 引物SSR2、CamSSR03、CamSSR04和CamSSR08均会产生21种基因型, 引物CamSSR09会产生15种基因型, 引物CamsinM11、CamSSR02、CamSSR05、CamSSR06以及CamSSR07均会产生10种基因型, 引物CamSSR01会产生6种基因型。如果这些位点分别位于不同的染色体上, 也能够自由组合, 理论上这些等位基因将产生 $4.90 \times 10^{13}$ 种组合; 即使12个位点中有一半能自由组合, 产生的基因型数量也十分可观, 足以标记现存的所有茶花品种。这也充分体现了本研究所构建的SSR分子标记体系在山茶品种鉴定中的有效性。

尽管这12个位点上的等位基因能产生较多的基因型组合, 但出于节约成本和以最少的引物鉴定最多品种的原则考虑(邱杨等, 2014), 用较少的引物鉴定较多的茶花品种自然是最优选择。从表6可看出, 12位分子身份证编码中的前三位构成的字符串就能区别21个茶花品种, 这3个字符串从左至右分别来自引物CamSSR04、CamSSR08和引物478扩增获得的基因型, 表明只需上述3对引物就能将本研究涉及的21个茶花品种区别开来。尽管如此, 有些品种间差异很小, 如SJ-09和SJ-10以及SJ-14和SJ15, 仅靠上述3对引物区别成千上万的茶花品种就很困难, 因此需要增加鉴别引物的数量。基于本研究所用12对引物获得的等位基因数目和可能的基因型数目, 及出现连锁等原因, 若将现有的3万余种茶花品种区分开, 理论上至少需用4-5对引物(CamSSR08、CamSSR04、478、SSR2和CamSSR03)。可见, SSR分子标记在茶花品种鉴定方面具有较好的优势。

随着杂交育种的快速发展和无性繁殖技术的不断进步, 茶花新品种与日俱增, 品种鉴定、品种知识产权保护、育种者和生产者合法权益保护及种质资源管理等相关工作显得尤为重要。将荧光标记SSR技术和SSR分子身份证构建技术应用于茶花新品种的鉴定工作, 能精确、可靠和高效地鉴别出不同品种, 并为每个品种构建1个唯一的分子身份证, 可有效提高品种的鉴定效率, 节约鉴定新品种的时间和成本。因此, 该技术的应用对茶花品种的鉴定和品种权保护均具有重大意义。

**致谢:** 感谢复旦大学的程珊梅博士及实验室其他同学在实验过程中给予的指导和帮助。

## 参考文献

- 陈赢男, 张新叶, 戴晓港 (2014). 利用微卫星标记鉴别油茶品种. *经济林研究* **32**(4), 140–143.
- 陈雨, 潘大建, 曲延英, 范芝兰, 陈建西, 李晨 (2008). 广东高州7个普通野生稻居群遗传结构的SSR分析. *植物学报* **25**, 430–436.
- 段云裳, 姜燕华, 王丽鸳, 成浩, 房婉萍, 黎星辉 (2011). 我国茶树主要骨干亲本及其衍生品种(系)的SSR分析. *植物遗传资源学报* **12**, 533–538.
- 高继银, 刘信凯, 赵强民 (2016). 四季茶花杂交新品种彩色图集. 杭州: 浙江科学技术出版社. pp. 26–36.
- 郭琪, 郭大龙, 郭丽丽, 张琳, 侯小改 (2015). SSR分子标记在牡丹亲缘关系研究中的应用与研究进展. *植物学报* **50**, 652–664.
- 胡兴华, 王燕, 邹伶俐, 黄仕训 (2013). 茶花品种SSR指纹图谱分型技术反应体系优化. *中国农学通报* **29**, 127–131.
- 李琳琳, 黄万坚, 刘信凯, 高继银, 李凯凯, 叶创兴, 石祥刚 (2014). 应用SSR分子标记技术鉴定张氏红山茶杂交F<sub>1</sub>代真实性的研究. *广东园林* **36**(2), 44–47.
- 李汝玉, 李群, 张文兰, 张晗, 宋国安, 王东建 (2007). 利用SSR标记进行小麦品种鉴定和新品种保护研究. *山东农业科学* (6), 14–17.
- 李艳梅 (2016). 花开大理 四会同办——2016大理国际茶花大会召开. *中国花卉园艺* (5), 36–38.
- 刘振, 王新超, 赵丽萍, 姚明哲, 王平盛, 许玫, 唐一春, 陈亮 (2008). 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* **6**, 100–110.
- 闵天禄 (2000). 世界山茶属的研究. 昆明: 云南科技出版社. pp. 1–35.
- 邱杨, 李锡香, 李清霞, 陈亦辰, 沈镛, 王海平, 宋江萍 (2014). 利用SSR标记构建萝卜种质资源分子身份证. *植物遗传资源学报* **15**, 648–654.
- 邵阳, 范文, 黄连冬, 高继银, 李听骥, 张文驹 (2015). 基于RNA-seq的崇左金花茶EST-SSR标记开发. *复旦学报(自然科学版)* **54**, 761–767.
- 申屠文月, 陈析丰, 马伯军 (2006). 3个山茶花变异品种的形态鉴定和RAPD分析. *浙江师范大学学报(自然科学版)* **29**, 317–321.
- 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 任君芳, 袁迎迎, 李雅男, 刘春, 明军 (2014). 利用荧光标记SSR构建百合种质资源分子身份证. *园艺学报* **41**, 2055–2064.
- 张冰清, 陆徐忠, 吴新杰, 李莉, 陈凤祥, 马琳, 张小娟, 倪金龙, 汪秀峰, 秦瑞英, 杨剑波 (2014). 利用SSR标记进行杂交油菜品种鉴定. *中国油料作物学报* **36**, 728–734.
- 张嘉, 刘爱青, 张淑玲, 解莹然, 刘燕 (2016). 利用荧光标记SSR绘制中国芍药品种分子身份证. *北京林业大学学报* **38**(6), 101–109.
- 张景荣, 刘军 (2006). 名贵茶花种质资源的RAPD分析. *西北植物学报* **26**, 683–687.
- 张晓庆 (2008). 中国茶花品种分类、测试指南及已知品种数据库构建. 硕士论文. 北京: 中国林业科学研究院. pp. 33–89.
- 张亚利, 宋焱, 奉树成 (2016). SSR分子标记在山茶属观赏资源遗传多样性研究中的应用. *植物科学学报* **34**, 755–764.
- 中国国家林业局 (2000). 中华人民共和国林业植物新品种保护名录(第一批). *科技与法律* (1), 150.
- 周文才, 温强, 杨军, 王建文, 徐立安, 徐林初 (2017). 油茶栽培品种SSR指纹图谱构建及聚类分析. *分子植物育种* **15**, 238–249.
- Bartholomew B (1980). Corrigenda to the origin and classification of the garden varieties of *Camellia reticulata*. *American Camellia Yearbook* **35**, 1–29.
- Chen ZY, Jiang YS, Wang ZF, Wei JQ, Wei X, Tang H, Li ZC (2010). Development and characterization of microsatellite markers for *Camellia nitidissima*. *Conserv Genet* **11**, 1163–1165.
- Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A, Testolin R (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor Appl Genet* **104**, 223–228.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**, 11–15.
- Freeman S, West J, James C, Lea V, Mayes S (2004). Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea (*Camellia sinensis*). *Mol Ecol Notes* **4**, 324–326.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C (1998). Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet* **96**, 1069–1076.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**, 309–334.
- Kaundun SS, Matusmoto S (2002). Heterologous nuclear

- and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome* **45**, 1041–1048.
- Liufu YQ, Peng GQ, Lu YB, Ye QQ, Tang SQ (2014). Development and characterization of 38 microsatellite markers for *Camellia flavida* based on transcriptome sequencing. *Conserv Genet Resour* **6**, 1007–1010.
- Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**, 3321–3323.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996a). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* **1**, 215–222.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996b). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germ-plasm analysis. *Mol Breed* **2**, 225–238.
- Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U, Cregan PB (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet* **90**, 43–48.
- Wendel JF, Parks CR (1983). Cultivar identification in *Camellia japonica* L. using allozyme polymorphisms. *J Amer Soc Hort Sci* **108**, 290–295.
- Xu J, Huang LD, Xu Y, Zhang WJ (2009). Identifying hybrids of golden *Camellia* using SSR molecular markers. *J Fudan Univ (Nat Sci)* **48**, 668–673.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Ye ZH, Mao JX (1999). POP-GENE, Version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene-info.html>

## Identification of 21 New *Camellia* Hybrid Varieties by Fluorescence-labelled Simple Sequence Repeat Markers

Naiqi Tao<sup>1</sup>, Bin Zhang<sup>2,3</sup>, Xinkai Liu<sup>4</sup>, Heda Zhou<sup>2</sup>, Naisheng Zhong<sup>4</sup>, Danfeng Yan<sup>4</sup>  
Min Zhang<sup>1</sup>, Jiyin Gao<sup>4</sup>, Wenju Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Institute of Biodiversity Science, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; <sup>2</sup>Shanghai Xingyuan Agricultural Experiment Center, Shanghai 201417, China; <sup>3</sup>Shanghai Agricultural Development and Promotion Center, Shanghai 200335, China; <sup>4</sup>Palm Eco-Town Development Co, Ltd, Guangzhou 510627, China

**Abstract** In this study, 12 highly polymorphic simple sequence repeat (SSR) loci were selected from *Camellia azalea* transcriptome data and previous studies, and the genotypes of 21 new *Camellia* hybrid varieties were analyzed by fluorescence capillary electrophoresis. Repeatable and distinct amplification products could be obtained at 12 SSR loci from all samples, and 21 new varieties could be identified by the specific genotype of 12 SSR loci. Significantly, for the 21 new varieties, the number of discrepant loci was 2 to 10 among varieties from the same parental combination but 5 to 12 among varieties from different combinations. Hence, each of the 21 varieties was marked by a unique group of molecular markers, which can be used to identify these varieties accurately. These markers are very useful for identifying and protecting *Camellia* varieties, especially for those propagated that are produced by grafting or cutting.

**Key words** *Camellia*, fluorescence labelled SSR, new variety protection, variety identification

Tao NQ, Zhang B, Liu XK, Zhou HD, Zhong NS, Yan DF, Zhang M, Gao JY, Zhang WJ (2019). Identification of 21 new *camellia* hybrid varieties by fluorescence-labelled simple sequence repeat markers. *Chin Bull Bot* **54**, 37–45.

\* Author for correspondence. E-mail: wjzhang@fudan.edu.cn