

茶树三倍体资源的鉴定及芽叶性状的倍性差异研究

杨培迪, 赵 洋, 璩馥榕, 成 杨, 刘 勇, 刘 振*

湖南省农业科学院茶叶研究所/国家茶树改良中心湖南分中心/国家中小叶茶树种质资源圃(长沙), 湖南长沙 410125

摘 要: 茶树 (*Camellia sinensis*) 是中国重要的经济作物, 具有丰富的遗传多样性。基因组多倍化是物种进化的重要推动力, 在提升茶树经济性状方面发挥着关键作用, 为茶树新品种的培育提供了新途径。本研究旨在通过对二倍体和三倍体茶树品种的形态、生理、生化及代谢物特征进行研究, 探索它们在倍性上的差异。通过流式细胞术对 165 份茶树种质资源进行了染色体倍性鉴定, 发现了 11 份新的三倍体茶树品种。随后对这 11 份三倍体品种与 12 份二倍体品种进行了芽、叶及解剖结构的比较研究。结果表明: 三倍体与二倍体茶树在物候期、百芽重、叶面积、气孔大小及气孔密度等性状上存在显著差异。三倍体茶树一般表现为发芽较晚、百芽重显著较高、叶面积较大、气孔长度和宽度均大于二倍体, 气孔密度较低。由于茶树芽叶是影响茶叶品质的关键部位, 这些差异对茶叶的生长和品质产生重要影响。此外, 利用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术, 对三倍体西莲 1 号及其母本福鼎大白茶 (CK) 的代谢物进行分析, 共检测到 1203 种差异代谢物, 其中 170 种代谢物具有显著差异, 81 种代谢物上调, 89 种下调。差异代谢物中, 类黄酮种类最多, 其次为氨基酸及其衍生物。本研究揭示了二倍体和三倍体茶树在形态、生理及代谢层面的显著差异, 为茶树的遗传评估和育种策略提供重要参考。三倍体茶树因其较高的生物量积累、代谢物质的优势, 展现出在茶树新品种培育中的巨大潜力。这一发现为提高茶叶产量、质量及抗逆性提供重要科学依据, 对于茶产业的可持续发展具有重要意义。

关键词: 茶树; 倍性分析; 流式细胞术; 代谢组学; 多倍体育种

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

Identification of Triploid Tea Plant Resources and Ploidy Differences in Bud and Leaf Traits

YANG Peidi, ZHAO Yang, QU Furong, CHENG Yang, LIU Yong, LIU Zhen*

Hunan Tea Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences / Hunan Branch of National Tea Plant Improvement Center / National Germplasm Repository of Small and Medium Leaf Tea Plants (Changsha), Changsha, Hunan 410125, China

Abstract: Tea plants (*Camellia sinensis*) is an essential economic crop in China with significant genetic diversity. Polyploidization, a key driver in species evolution, plays a crucial role in enhancing the economic traits of tea plants, providing new avenues for breeding improved varieties. This study aims to explore the ploidy differences between diploid and triploid tea plants by investigating the morphological, physiological, biochemical and metabolic traits. Utilizing flow cytometry, we identified the chromosome ploidy of 165 tea germplasm resources and discovered 11 new triploid tea plant varieties. The 11 triploid varieties, along with 12 diploid varieties, underwent a comparative study focusing on bud, leaf and anatomical characteristics. The results revealed significant differences between diploid and triploid tea plants in several traits, including phenological period, bud weight, leaf area, stomatal size and stomatal density. Triploid tea plants generally exhibited later budding, significantly higher bud weight, larger leaf areas, and larger stomatal dimensions, but lower stomatal density compared to diploid varieties. As the buds and leaves are vital for tea quality, the morphological and physiological differences can influence tea production and its

收稿日期 2024-10-12; 接受日期 2024-11-13

基金项目 湖南省农业科技创新资金项目 (No. 2023CX68); 湖南省自然科学基金项目 (No. 2021JJ30384); 国家现代农业技术体系建设专项 (No. CARS-19)。

作者简介 杨培迪 (1984—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 茶树种质资源与育种。*通信作者 (Corresponding author): 刘振 (LIU Zhen), E-mail: hntescience@126.com。

overall quality. Furthermore, metabolomic analysis using UPLC-MS/MS technology was conducted on the triploid variety Xilianno. 1 and its maternal diploid Fuding Dabai (CK). A total of 1203 differential metabolites were detected, with 170 showing significant variation, of which 81 were upregulated and 89 were down regulated. The most abundant metabolites were flavonoids, followed by amino acids and their derivatives. The triploid variety displayed enhanced levels of metabolites associated with improved antioxidant activity and other health-related properties. The study would provide novel insights into the morphological, physiological and metabolic differences between diploid and triploid tea plants, offering valuable references for genetic assessment and breeding strategies. The findings also emphasize the significance of polyploidy in improving tea plant resilience, yield and quality, which is critical for the sustainable development of the tea industry.

Keywords: tea plant; ploidy analysis; flow cytometry; metabolomics; polyploid breeding

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.015

茶树 (*Camellia sinensis*) 作为中国重要叶用经济作物, 其品质和产量直接影响到茶产业经济效益。茶树遗传多样性是培育新品种和改良现有品种的基础^[1]。多倍体育种作为一种有效的遗传改良手段, 已被广泛应用于茶树育种工作中^[2-3]。

多倍体不仅在促进高等植物进化多样性和物种形成中起着重要作用, 其代谢物的复杂性也对茶叶的品质有着直接影响。人工诱导多倍体能够增加基因的拷贝数^[4], 并可能导致基因组改变, 如表观遗传变化和影响多种表型调控基因的表达。这不仅表现在解剖学和形态学变化上, 还在代谢物的差异上显现, 尤其是那些影响茶叶风味和健康的关键代谢物^[5]。因此, 探究多倍体与二倍体茶树在代谢层面的差异, 对于理解其对环境的适应性和生物量、产量及抗逆性的提升具有重要意义^[6-12]。

传统的倍性鉴定方法包括染色体计数法和形态学分析, 这些方法存在操作复杂、效率低下和准确性不足的局限性^[13]。流式细胞术 (FCM) 作为一种迅速、精确且高通量的倍性鉴定技术, 近年来在植物学领域得到了广泛应用^[6, 14-18]。该技术通过测量细胞核 DNA 含量, 能够快速区分不同倍性的植物细胞, 有效降低了茶树资源的倍性鉴定的复杂性^[19]。超高效液相色谱-串联质谱技术 (UPLC-MS/MS) 是一种结合了 UPLC 的高分离能力和质谱的高选择性、高灵敏度的分析技术, 在生化成分差异研究中具有显著优点^[20]。

本研究利用流式细胞术对茶树资源进行倍性鉴定, 并深入分析不同倍性茶树的差异。比较二倍体与三倍体茶树在形态学、生理生化和细胞结构方面的差异, 探讨多倍体育种对茶树农艺性状的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试种质 供试茶树资源共 165 (表 1), 材料采自中国云南、福建、四川、湖南、湖北、贵州、台湾和越南茶树种植地区。由国家中小叶茶树种质资源圃 (长沙) 收集, 该地区气候条件一致, 土壤类型相同, 且样本的栽培管理方法统一。为了排除栽培环境对叶片解剖结构的影响, 所有茶树资源均采用相同的栽培方式, 包含一致的施肥、水管理和病虫害防治措施。于 2022 年 11 月采集一芽二叶用于染色体倍性分析, 成熟叶片用于切片和电镜观察。将茶树叶片分为 5 等分, 取中部叶片, 以确保不同材料的采样一致性。以二倍体福鼎大白茶和三倍体政和大白茶作为对照。

1.1.2 试剂 Partec CyStain UV Precise P 试剂盒, 甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯)、乙醇 (色谱纯); 标准品以二甲基亚砜 (DMSO) 或甲醇作为溶剂溶解后, -20 °C 保存, 质谱分析前采用 70% 甲醇稀释成合适浓度 (BioBioPha, Sigma-Aldrich)。

1.1.3 仪器与设备 流式细胞仪型号为德国 Partec CyFlow Space, 自动测定染色体含量分布图像, 参数调控依据仪器说明书。真空冷冻干燥机 (FD-56, 美国 SIM), 离心机 (5424R, 德国 Eppendorf), 研磨机 (MM 400, 德国 RETSCH), 超高效液相色谱 (UPLC, Shim-pack UFLC SHIM-ADZU CBM30A), 串联质谱 (MS/MS, Applied Biosystems 4500 QTRAP)。

1.2 方法

1.2.1 倍性检测 取 200 mg 新鲜叶片组织, 用蒸馏水洗净表面尘土, 滤纸吸干后放入预冷的培养皿内。取细胞核裂解液 500 μ L, 加至样本周围, 用锋利刀片切碎, 持续 60 s, 提取完整细胞核。

过滤培养皿中的液体至样品管中,加入荧光染色液 2000 μL ,避光条件下染色 60 s 后进行测试。先游离细胞核,再用荧光染色液将细胞核染色体上的碱基染色,用仪器测量细胞核里被染色的碱基的荧光强度,横坐标表示荧光强度,纵坐标表示细胞数量。由于荧光强度与 DNA 含量成正比,因此可由对照样本的倍性计算得出样本的倍性。

1.2.2 石蜡切片的制作和叶片解剖结构观测 以 70%FAA 固定液(甲醛-乙醇-冰醋酸固定液:福尔马林 10 mL、冰醋酸 5 mL、70%乙醇 85 mL)处理待检测样本。进行修剪、脱水、包埋、切片、染色、封片及镜检,最后对合格的样片进行图像采集分析。具体操作步骤包括:石蜡切片脱蜡至水(二甲苯、无水乙醇、75%乙醇、自来水)、番红染色(1~2 h,自来水冲洗)、脱色(50%、70%、80%乙醇)、固绿染色(30~60 s,无水乙醇三缸脱水)和透明封片(采用二甲苯进行透明处理,之后用中性树胶封片),并在显微镜下进行镜检及图像采集分析。为确保试验结果的可靠性,每一份材料的切片制作均重复 3 次。组织切片的图像通过显微镜观察,测量叶片厚度等指标 3 次,并计算平均值和标准误差。

1.2.3 扫描电镜观察气孔密度及大小 取材固定新鲜组织,选取叶片同一部位,尽量减小机械损伤,进行电镜固定。对样品进行脱水、干燥、导电处理,使用扫描电子显微镜进行观察和图像记录,并测量气孔大小,计算气孔密度。每份材料重复 3 次。

1.2.4 农艺性状指标测定 根据《茶树种质资源描述规范》NY/T 2943—2016^[21],对茶树种质资源的形态特征进行调查、描述和测量。其中包括物候期、一芽二叶百芽重、叶形、叶基、叶片着生状态、叶面积(cm^2)、叶色、叶面、叶质、叶身、叶齿锐度、叶齿密度、叶齿深度、叶尖、叶缘、叶脉对数共 16 个性状。同一生境条件下,每个品种选取 10 株代表性植株,对其进行挂牌和田间观察和测量。质量性状重复观察 10 次,以多数为准(例:叶色,取 10 片叶子观察,6 片以上为绿色,则记录该茶树叶色为绿色);数量性状利用测量尺及人工计数重复测量 10 次后取平均值。叶面积(cm^2)=叶长(cm) $\times$ 叶宽(cm) $\times 0.7$ (系数)。

1.2.5 UPLC-MS 分析 液相条件如下,色谱柱:Agilent SB-C18 1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm;流动相:A 相为加入 0.1%甲酸的超纯水,B 相为乙腈;洗

脱梯度:起始 B 相比比例为 5%,9.00 min 内线性增加至 95%并维持 1 min,10.00~11.10 min 内下降为 5%并维持至 14 min;流速 0.35 mL/min;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量 4 μL 。质谱条件参照 ELIZABETH^[22]的方法。

1.2.6 类靶代谢分析 基于液质联用(LC-MS)技术,利用高灵敏度的 SCIEX QTRAP[®] 6500+质谱平台进行类靶向代谢组学研究,由诺禾致源检测分析。

1.3 数据处理

茶树农艺性状指标依据《茶树种质资源描述规范》^[21]进行赋值。采用 Excel 2021 软件进行数据整理,利用 graphpad prism 9.5 软件进行差异显著性分析并作图。质谱数据处理采用 Analyst 1.6.3 软件。基于迈维生物科技公司的植物广靶代谢数据库,对样本的代谢物进行质谱定性分析,用 MultiaQuant 软件进行色谱峰的积分和校正工作。主成分分析(PCA)采用 R 软件(<http://www.r-project.org/>)的内置统计 prcomp 函数,设置 prcomp 函数参数 scale=True,对数据进行 unit variance scaling(UV)归一化。通过 R 软件 pheatmap 包绘制热图,对代谢物在不同样本间的积累模式进行聚类分析。采用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),基于模型获得的变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP)和差异倍数(fold change, FC)进行不同资源间的差异代谢物筛选,筛选的依据为 VIP>1,同时含量增加的代谢物 FC ≥ 2 或含量减少的代谢物 FC ≤ 0.5 ^[23]。

2 结果与分析

2.1 茶树资源的倍性分析

采用流式细胞仪对 165 份茶树种质资源进行染色体倍性测定,福鼎大白茶为二倍体茶树资源对照(荧光强度 199.82, DNA 相对含量为 100%),政和大白茶为三倍体对照(荧光强度 303.20, DNA 相对含量为 151.74%),三倍体品种 DNA 相对含量大约是二倍体的 1.5 倍,以此对不同茶树资源进行倍性判定(图 1)。

在所测定的茶树资源中(表 1),15 份判定为三倍体,分别是西莲 1 号、上梅州、甘 77-08、政和大白茶、高巨、君峰、毛蟹、君山银针 2 号、歌乐、闽水仙、八斗 78-01、八斗 73-01、甘 79-01、湘安 20、汝城白毛 3 号,其荧光强度为 262.75~

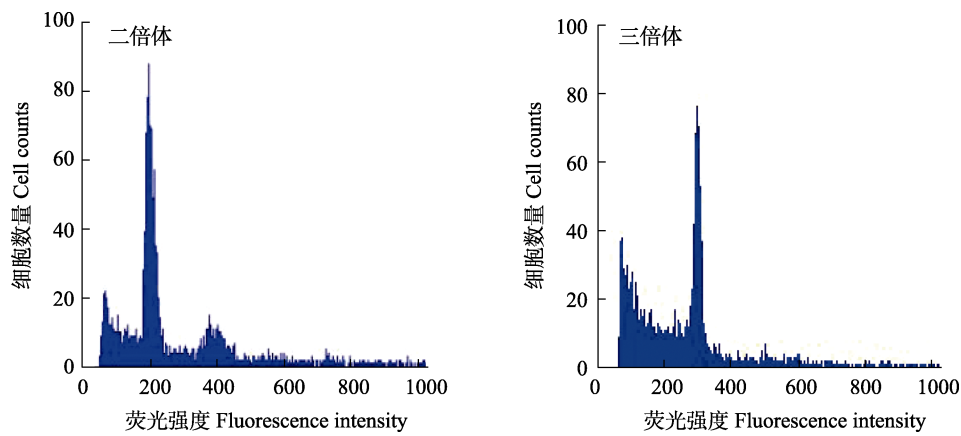


图 1 不同倍性茶树的流式细胞直方图

Fig. 1 Flow cytometry histograms of tea plants with different ploidyies

表 1 165 份参试茶树资源及倍性判定情况

Tab. 1 Polyploidy determination and analysis of 165 tested tea plant resources

编号 No.	参试品种 Tested variety	荧光强度 Fluorescence intensity	DNA 相对含量 Relative content of DNA/%	倍性判定 Ploidy determina- tion	编号 No.	参试品种 Tested variety	荧光强度 Fluores- cence in- tensity	DNA 相对含量 Relative content of DNA/%	倍性判定 Ploidy deter- mination
1	西莲 1 号	313.25	156.77	3n	27	福大万	209.15	104.67	2n
2	上梅州	305.30	152.79	3n	28	云大 72-04	208.97	104.58	2n
3	甘 77-08	304.75	152.51	3n	29	云大 72-04	208.97	104.58	2n
4	政和大白茶	303.20	151.74	3n	30	友谊茶	208.89	104.54	2n
5	高巨	301.78	151.03	3n	31	大红	208.36	104.27	2n
6	君峰	299.25	149.76	3n	32	灵县 6 号	208.22	104.20	2n
7	毛蟹	294.88	147.57	3n	33	柳叶早	208.20	104.19	2n
8	君山银针 2 号	294.50	147.38	3n	34	HJ-05	208.15	104.17	2n
9	歌乐	292.29	146.28	3n	35	福湘 1 号	208.13	104.16	2n
10	闽水仙	292.11	146.19	3n	36	紫阳 72-00	208.09	104.14	2n
11	八斗 78-01	291.92	146.09	3n	37	水仙	207.73	103.96	2n
12	八斗 73-01	290.74	145.50	3n	38	古茶水牛	207.27	103.73	2n
13	甘 79-01	288.25	144.25	3n	39	汝城白茶 2 号	206.77	103.48	2n
14	湘安 20	277.41	138.83	3n	40	龙井 43 号	206.47	103.33	2n
15	汝城白毛 3 号	262.75	131.49	3n	41	紫笋	205.75	102.97	2n
16	云南乌黑长叶	224.52	112.36	2n	42	苦茶 23-1	205.33	102.76	2n
17	甘 79-02	223.83	112.02	2n	43	桂林 72-05	204.31	102.25	2n
18	莽山 2 号	217.37	108.78	2n	44	苦茶 17-2	204.21	102.20	2n
19	阔叶藤	217.23	108.71	2n	45	云大 79-02	203.78	101.98	2n
20	粗梗大叶	216.12	108.16	2n	46	水仙 72-03	203.68	101.93	2n
21	湘波绿 2 号	212.40	106.30	2n	47	涟茶 6 号	203.58	101.88	2n
22	苦茶 19-1	211.67	105.93	2n	48	黄沙塔茶	203.43	101.81	2n
23	胜利早	209.79	104.99	2n	49	大叶长	203.35	101.77	2n
24	浙农 25 号	209.53	104.86	2n	50	高福	203.24	101.71	2n
25	高湘 2 号	209.51	104.85	2n	51	茶陵苦茶 12 号	202.68	101.43	2n
26	61-云大-01	209.16	104.67	2n	52	甘梯乐里子	202.45	101.32	2n

续表 1 165 份参试茶树资源及倍性判定情况

Tab. 1 Polyploidy determination and analysis of 165 tested tea plant resources (continued)

编号 No.	参试品种 Tested variety	荧光强度 Fluorescence intensity	DNA 相对含量 Relative content of DNA/%	倍性判定 Ploidy deter- mination	编号 No.	参试品种 Tested variety	荧光强度 Fluores- cence in- tensity	DNA 相对含量 Relative content of DNA/%	倍性判定 Ploidy deter- mination
53	密绿丛	202.12	101.15	2n	92	云南长叶白毛茶	190.60	95.39	2n
54	英红 2 号	201.62	100.90	2n	93	61-丰-01	190.55	95.36	2n
55	大尖叶 9 号	201.32	100.75	2n	94	高湘 11 号	189.40	94.79	2n
56	不知春	200.77	100.48	2n	95	卷叶茶	189.06	94.62	2n
57	81-410	200.63	100.41	2n	96	56-04	188.92	94.55	2n
58	HJ-01	200.30	100.24	2n	97	苦茶 47 号	188.78	94.48	2n
59	福鼎大白茶	199.82	100.00	2n	98	湘安 17	187.00	93.58	2n
60	白观音	199.66	99.92	2n	99	苦茶 3 号	186.82	93.49	2n
61	涟茶 1 号	199.53	99.85	2n	100	苦茶 14-2	186.43	93.30	2n
62	灵卞县苦茶	198.98	99.58	2n	101	福丰 20	185.78	92.97	2n
63	五道水野茶	198.88	99.53	2n	102	青叶同茶	185.63	92.90	2n
64	尖波黄	198.67	99.42	2n	103	大尖叶	185.63	92.90	2n
65	涟茶 2 号	198.02	99.10	2n	104	甘 77-06	185.50	92.83	2n
66	苦茶 3-0	197.33	98.75	2n	105	湘波绿 43	184.73	92.45	2n
67	木渚湘 3 号	197.08	98.63	2n	106	楮叶齐	184.22	92.19	2n
68	碧山一号	196.76	98.47	2n	107	宜昌大叶	183.98	92.07	2n
69	英德黑叶水仙	196.47	98.32	2n	108	甘 77-14	183.92	92.04	2n
70	盘龙福引	196.41	98.29	2n	109	高/巨	183.56	91.86	2n
71	晚来春	196.39	98.28	2n	110	早黄茶	183.39	91.78	2n
72	南山 79-03	196.30	98.24	2n	111	苦茶 20-1	183.28	91.72	2n
73	白毫早	195.87	98.02	2n	112	黄叶桐茶	183.08	91.62	2n
74	苦茶 13-1	195.22	97.70	2n	113	水仙 79-01	182.84	91.50	2n
75	芽己茶	195.10	97.64	2n	114	官福 F1	182.61	91.39	2n
76	安徽 1 号	194.72	97.45	2n	115	藤茶	182.20	91.18	2n
77	长皮冰	194.11	97.14	2n	116	福云 10	182.18	91.17	2n
78	甜茶 1 号	193.81	96.99	2n	117	乐昌子大	181.97	91.07	2n
79	木奇 12 号	193.53	96.85	2n	118	大柳黄	181.75	90.96	2n
80	祁门 1 号	193.49	96.83	2n	119	明前早	181.14	90.65	2n
81	雨大 3 号	193.44	96.81	2n	120	涟源奇曲	180.99	90.58	2n
82	慢奇兰	193.37	96.77	2n	121	楮叶齐 9 号	180.94	90.55	2n
83	辐高 136	193.26	96.72	2n	122	福高 25 万	180.05	90.11	2n
84	君山绿茶 22 号	193.24	96.71	2n	123	苦茶 16-2	179.71	89.94	2n
85	大瑶茶	193.23	96.70	2n	124	长一万	179.09	89.63	2n
86	甘 75-03	193.12	96.65	2n	125	黔湄 419	178.72	89.44	2n
87	福木渚湘	192.82	96.50	2n	126	苦茶 09-1	178.63	89.40	2n
88	金水间茶	192.45	96.31	2n	127	隆卷茶	178.09	89.13	2n
89	梅占	192.41	96.29	2n	128	东湖早	177.42	88.79	2n
90	汝城白毛 4 号	192.05	96.11	2n	129	乌龙茶	177.22	88.69	2n
91	小叶茶	191.51	95.84	2n	130	尖波英 13 号	177.16	88.66	2n

续表 1 165 份参试茶树资源及倍性判定情况
Tab. 1 Polyploidy determination and analysis of 165 tested tea plant resources (continued)

编号 No.	参试品种 Tested variety	荧光强度 Fluorescence intensity	DNA 相对含量 Relative content of DNA/%	倍性判定 Ploidy determi- nation	编号 No.	参试品种 Tested variety	荧光强度 Fluores- cence in- tensity	DNA 相对含量 Relative content of DNA/%	倍性判定 Ploidy deter- mination
131	汝城白毛 1 号	177.13	88.64	2n	149	苦茶 14-1	164.81	82.48	2n
132	云抗 10 号	176.95	88.55	2n	150	红叶茶	164.75	82.45	2n
133	黑叶水仙	176.25	88.20	2n	151	高桥早	164.27	82.21	2n
134	大蓬茶	174.25	87.20	2n	152	皋卢	161.83	80.99	2n
135	黄金茶 2 号	173.71	86.93	2n	153	福大 60 号	161.52	80.83	2n
136	5.16	171.49	85.82	2n	154	小柳	160.21	80.18	2n
137	佛手	170.13	85.14	2n	155	所临湘	159.58	79.86	2n
138	莽山 1 号	168.59	84.37	2n	156	越南大叶茶	159.36	79.75	2n
139	余杭福云	168.53	84.34	2n	157	辐福 90	159.16	79.65	2n
140	湘波绿	167.80	83.98	2n	158	苦茶 2 号	158.23	79.19	2n
141	福云 7 号	167.32	83.74	2n	159	会同朗江茶	151.69	75.91	2n
142	城步峒茶	166.82	83.49	2n	160	大叶云峰	150.37	75.25	2n
143	HJ-03	166.71	83.43	2n	161	汝城上野青茶	148.80	74.47	2n
144	甜茶 2 号	166.07	83.11	2n	162	古蔺大茶树	147.33	73.73	2n
145	福长一万	165.98	83.06	2n	163	石门空心茶	143.32	71.72	2n
146	苦茶 08-1	165.03	82.59	2n	164	涟茶 7 号	138.46	69.29	2n
147	晚紫浓	164.95	82.55	2n	165	白毛 1 号	136.77	68.45	2n
148	牛皮茶	164.83	82.49	2n					

注：n 代表一个物种的单倍体染色体数量。
Note: n represents the number of haploid chromosomes of a species.

313.25, 平均值为 294.16, 标准差为 12.23, 变异率为 4.16%, DNA 相对含量为 131.49%~156.77%; 150 份资源判定为二倍体, 荧光强度为 136.77~224.52, 平均值为 188.07, 标准差为 17.90, 变异率为 9.52%, DNA 相对含量为 68.45%~112.36%。

2.2 不同倍性茶树资源主要农艺性状的差异研究

茶树资源的二倍体和三倍体在农艺性状方面 (共 16 个), 11 个性状 (表 2) 表现相近, 包括叶片着生状态、叶色、叶面、叶身、叶质、叶齿锐度、叶齿密度、叶齿深度、叶尖、叶缘、叶脉对数, 二者间均无明显区别。

如图 2 所示, 本研究所选的二倍体和三倍体茶树资源在物候期、一芽二叶百芽重、叶面积大小、叶形和叶基等 5 项性状上存在显著差异。其中, 三倍体茶树资源均为晚生种, 物候期为 3.00±0.00, 二倍体茶树资源则包含有早生种、中生种和晚生种, 物候期为 1.83±0.83, 二者之间的物候期差异达到极显著水平; 三倍体的一芽二叶百芽

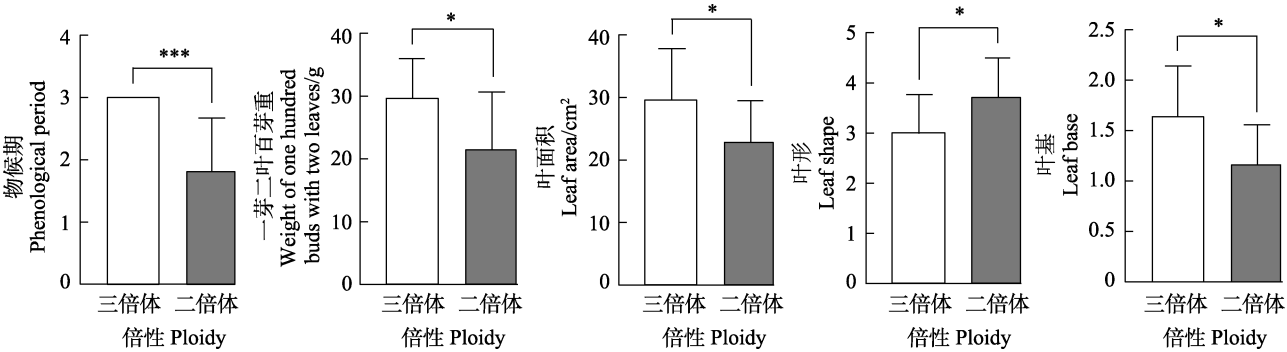
重为 (29.69±6.23)g, 明显高于二倍体 (21.66±8.87)g, 二者之间的差异达到显著水平; 三倍体的叶面积为 (29.59±8.18)cm², 二倍体为 (23.12±6.37)cm², 二者之间的差异达到显著水平; 三倍体的叶形为 3.00±0.77, 二倍体为 3.75±0.75, 二者之间的差异达到显著水平; 三倍体的叶基为 1.64±0.50, 二倍体为 1.17±0.39, 二者之间的差异达到显著水平。

2.3 不同倍性茶树种质资源叶片显微结构分析

农艺性状对比发现, 二倍体与三倍体茶树资源之间的差异主要集中在芽叶性状。为探讨二倍体与三倍体茶树叶片之间的差异, 选取 23 份茶树资源进行叶片解剖结构与气孔性状分析 (表 3)。依据其地理来源和倍性鉴定结果, 从 165 份茶树种质资源中筛选出 23 份材料进行叶片显微结构对比分析。所有样本均来自中国的主要茶树种植区 (如湖南、贵州、浙江、福建、安徽等), 覆盖了多个品种和遗传背景, 以确保代表性。23 份样本中包括 11 份三倍体和 12 份二倍体茶树资源。

表 2 三倍体和二倍体茶树的 11 项农艺性状
Tab. 2 Agricultural traits of triploid and diploid tea plants

倍性 Ploidy	叶片着生状态 Leaf insertion status	叶色 Leaf color	叶面 Leaf surface	叶身 Leaf shape	叶质 Leaf texture	叶齿锐度 Leaf tooth sharpness	叶齿密度 Leaf tooth density	叶齿深度 Leaf tooth depth	叶尖 Leaf apex	叶缘 Leaf margin	叶脉对数 Leaf vein pairs
三倍体	1.18±0.40	3.00±0.77	2.09±0.94	1.45±0.69	2.18±0.75	1.73±0.79	2.36±0.50	1.82±0.87	2.45±0.52	1.64±0.81	9.36±1.12
二倍体	1.58±0.51	3.08±0.29	1.58±0.67	1.71±0.54	1.92±0.79	1.83±0.72	2.67±0.65	1.67±0.89	2.29±0.92	1.88±0.8	9.67±1.83



*为差异显著 ($P<0.05$) ; ***为差异极显著 ($P<0.001$) 。
* indicates significant difference ($P<0.05$); *** indicates extremely significant difference ($P<0.001$).

图 2 三倍体和二倍体茶树的 5 项农艺性状比较

Fig. 2 Comparative agricultural traits of triploid and diploid tea plants

表 3 叶片解剖结构与气孔性状分析的 23 份茶树种质资源
Tab. 3 Analysis of leaf anatomical structure and stomatal traits in 23 tea germplasm resources

品种名称 Variety name	倍性 Ploidy	产地 Origin	品种名称 Variety name	倍性 Ploidy	产地 Origin
保靖黄金茶 1 号	2n	湖南	闽水仙	3n	福建
碧香早	2n	湖南	西莲 1 号	3n	湖南
碧云	2n	浙江	甘 77-08	3n	湖南
福鼎大白茶	2n	福建	甘 79-01	3n	湖南
龙井 43	2n	浙江	高巨	3n	湖南
川农黄芽早	2n	四川	歌乐	3n	福建
舒茶早	2n	安徽	君峰	3n	湖南
铁观音	2n	福建	毛蟹	3n	福建
湘茶研 1 号	2n	湖南	上梅州	3n	福建
宜昌大叶	2n	湖北	湘安 20 号	3n	湖南
鄂茶一号	2n	湖北	政和大白茶	3n	福建
楮叶齐	2n	湖南			

对二倍体与三倍体茶树资源的叶片解剖结构进行比较 (表 4, 图 3), 发现在叶肉厚度、栅栏组织厚度、上表皮厚度、下表皮厚度、角质层厚度、中脉厚度、维管束木质部面积以及维管束面积, 均无显著差异。叶片解剖结构在这些参数上未显示出预期的变化。

在气孔方面, 二倍体茶树与三倍体茶树之间存在显著差异 (图 4, 图 5)。三倍体茶树的气孔长度

为 $(19.27\pm3.7)\mu\text{m}$, 而二倍体茶树为 $(15.27\pm2.56)\mu\text{m}$, 二者之间的差异达到了极显著水平。在气孔宽度方面, 三倍体茶树为 $(7.21\pm1.65)\mu\text{m}$, 二倍体茶树为 $(5.36\pm1.34)\mu\text{m}$, 其差异同样具有极显著性。此外, 气孔密度在三倍体茶树和二倍体茶树之间也存在显著差异, 前者为 $(5.64\pm1.12)\text{个}/37\ 037.3555\ \mu\text{m}^2$, 后者为 $(7.28\pm1.45)\text{个}/37\ 037.3555\ \mu\text{m}^2$ 。综上所述, 三倍体茶树在气孔长度和气孔宽度方面均显著大

表 4 三倍体和二倍体茶树叶片解剖结构
Tab. 4 Anatomical structure of triploid and diploid tea plant leaves

倍性 Ploidy	叶肉厚度 Leaf mesophyll thickness/mm	栅栏组织厚度 Palisade tissue thick- ness/mm	上表皮厚度 Upper epidermis thickness/mm	下表皮厚度 Lower epidermis thick- ness/mm
三倍体	0.265 19±0.026 60	0.105 30±0.017 97	0.021 24±0.002 82	0.017 11±0.002 17
二倍体	0.264 73±0.046 93	0.109 13±0.017 91	0.020 90±0.002 65	0.016 55±0.001 72

倍性 Ploidy	角质层厚度 Cuticle layer thickness/mm	中脉厚度 Midrib thickness/mm	维管束木质部面积 Vascular bundle xylem area/mm ²	维管束面积 Vascular bundle area/mm ²
三倍体	0.003 22±0.000 53	0.807 20±0.152 57	0.029 21±0.019 45	0.201 50±0.087 16
二倍体	0.003 09±0.000 77	0.805 89±0.142 59	0.040 60±0.030 33	0.210 71±0.096 92

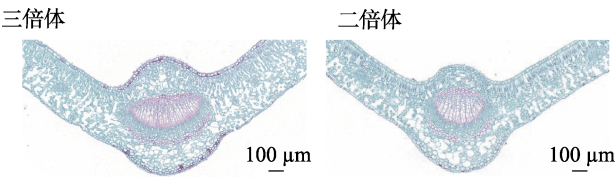


图 3 三倍体和二倍体切片
Fig. 3 Section of triploid and diploid tea plants

于二倍体茶树，但气孔密度却低于二倍体茶树。

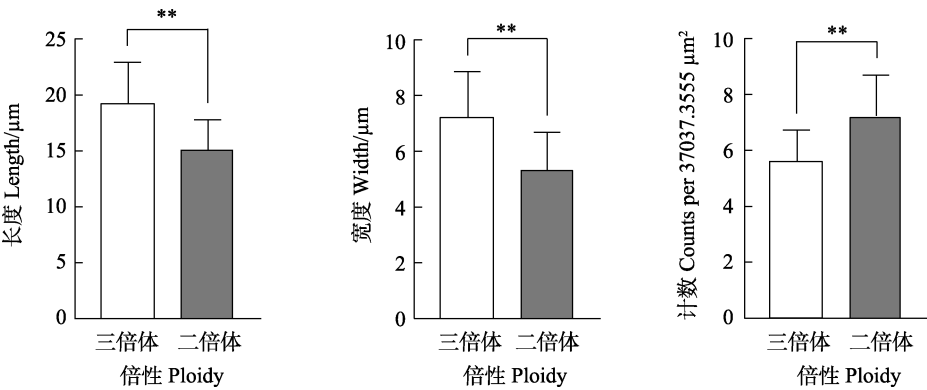
2.4 不同倍性茶树代谢物差异分析

为了探讨三倍体与二倍体茶树在芽叶代谢物方面的差异，本研究以二倍体茶树福鼎大白茶（FDDDB）为母本，以其三倍体后代西莲 1 号（XL1）为对象进行代谢物分析。FDDDB 为二倍体的典型代表，广泛应用于茶叶产业，而 XL1 作为其三倍体后代，具有明确的亲缘关系，能够有效减少其他基因背景带来的干扰，确保倍性差异是代谢物变化的主要原因。

通过比较母本 FDDDB 与 XL1 的代谢物积累情况，能够揭示二者在基因表达与代谢物质含量上

的差异。这种基于亲缘关系的对比研究对于分析三倍体植物的代谢优势具有重要的意义，尤其在茶树研究中，可以更直观地展示倍性变化对茶叶品质的影响。

同一种资源的 3 个样本重复聚在一起(图 6)，2 份资源处于质控样品的不同区域，说明品种间的代谢物存在显著差异。以母本 FDDDB 为对照组，共检测到 1203 个差异代谢物。采用 OPLS-DA 分析方法对二倍体亲本和三倍体后代进行了显著性差异分析。OPLS-DA 模型的 R²_Y 均为 1，Q² 为 0.61，说明模型构建良好。基于 OPLS-DA 显著差异代谢物的筛选依据，XL1 对比 FDDDB 共筛选出差异显著代谢物 170 个，其中表达量上调 81 个，表达量下调 89 个。差异代谢物分类中，类黄酮类最多（54 个），其次为氨基酸及其衍生物（18 个）、酚酸类（15 个）、糖类及其衍生物（13 个）、有机酸及其衍生物（11 个）、茶丙素和聚酮化合物（9 个）、酚类及其衍生物（8 个）、有机杂环化合物（8 个）、脂质（7 个）、核苷酸及其衍生物（6 个）、



**为差异极显著（ $P<0.01$ ）。
** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 4 三倍体和二倍体茶树气孔结构比较
Fig. 4 Comparative stomatal structure of triploid and diploid tea plants

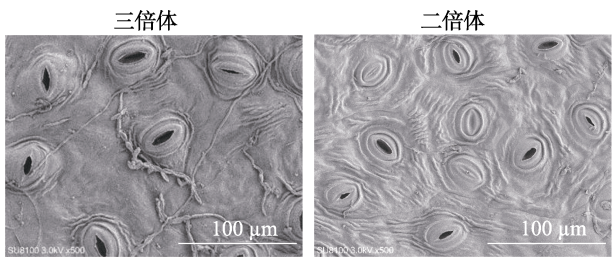


图 5 三倍体茶树和二倍体茶树气孔电镜照片
Fig. 5 Scanning electron microscope images of stomata in triploid and diploid tea plants

醇类和多元醇类（4 个）、萜类（4 个）、胺类（3 个）、生物碱及其衍生物（3 个）、维生素（3 个）、有机氧化合物（2 个）、植物激素（2 个）。对差异代谢物差异倍数进行对数化处理，差异代谢物增加和减少排在前 20 位的物质（图 7），增加最多的斩龙剑苷 A（酚酸类），其次是 3,4,5-三甲氧基苯酚（酚类及其衍生物），减少最多的为 N-羟基

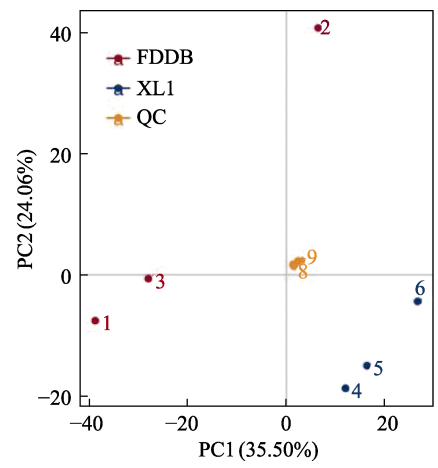


图 6 总样本 PCA 分析
Fig. 6 PCA analysis of total sample

-L-色氨酸（氨基酸及其衍生物），其次为 8-氯-1-四氢酮（有机杂环化合物）。

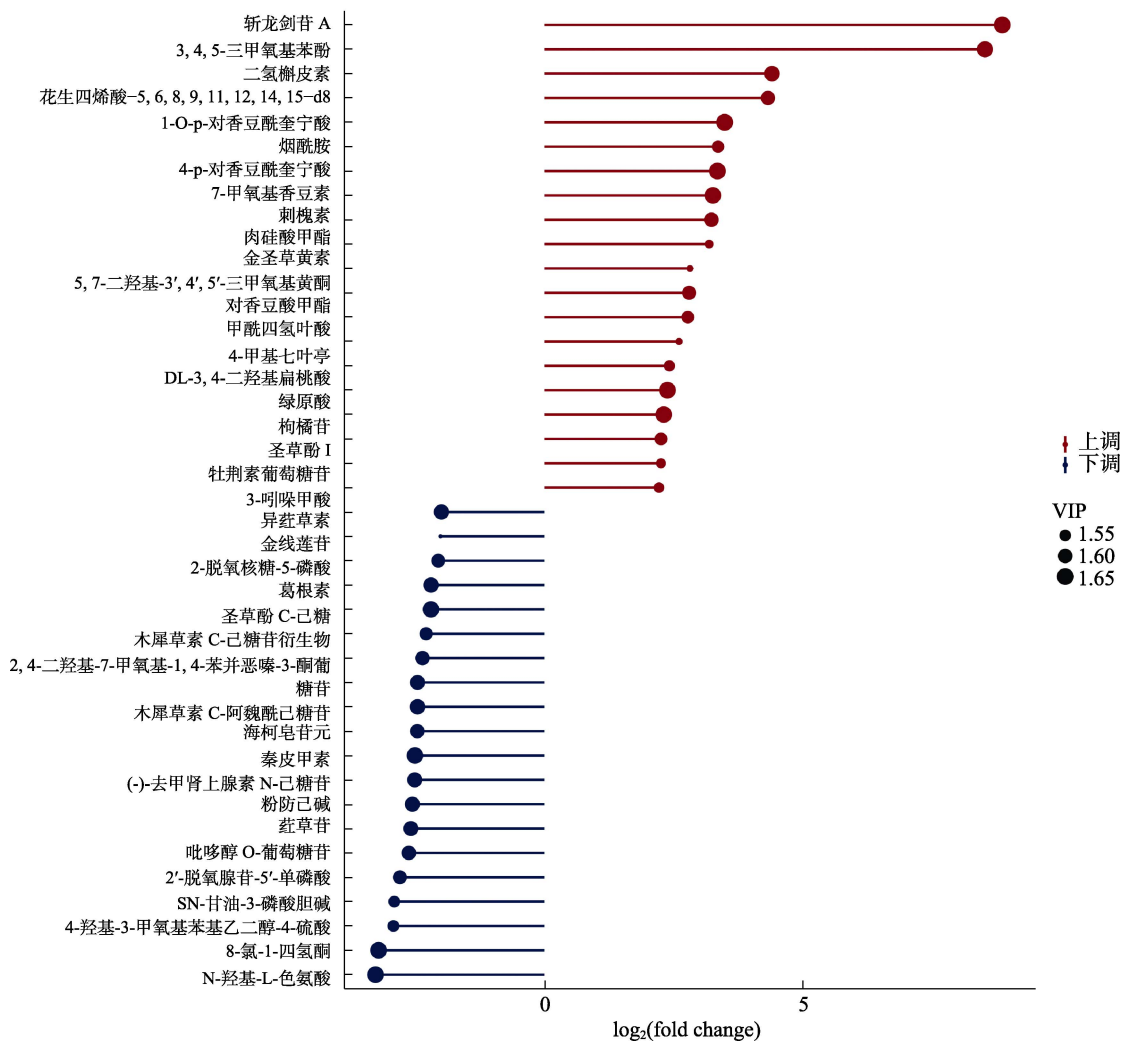


图 7 差异代谢物差异倍数柱状图
Fig. 7 Histogram of fold differences of differential metabolites

通过差异代谢物 KEEG 分类分析发现主要富集在 4 个大类 (图 8): (1) 代谢, 主要富集在 10 个通路, 排前 3 分别是全局和概览图 (31.11%), 其他次级代谢产物的生物合成 (16.67%), 氨基酸代谢 (14.44%); (2) 基因信息处理, 富集在翻译 (2.22%) 和蛋白质折叠、分类和降解 (1.11%); (3) 环境信息处理, 富集在膜运输 (2.22%); (4) 细胞进程, 富集在运输和分解代谢 (1.11%)。通过 KEEG 分析 (图 9), 差异代谢通路中变化最显著的前 3 依次为黄酮类化合物的生物合成, 黄酮

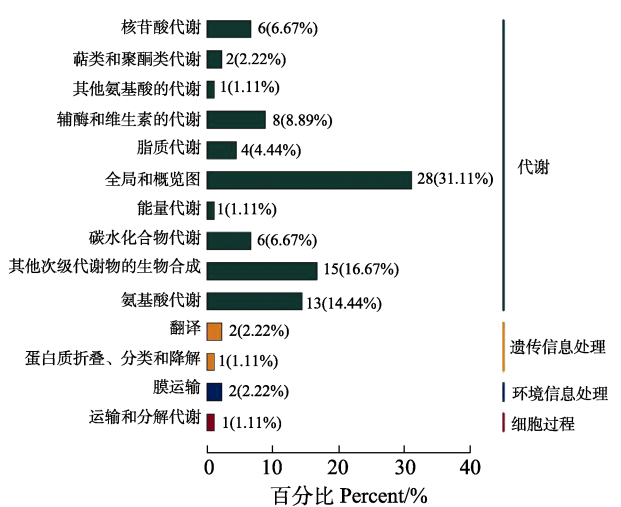


图 8 差异代谢物 KEEG 分类
Fig. 8 KEEG classification of differential metabolites

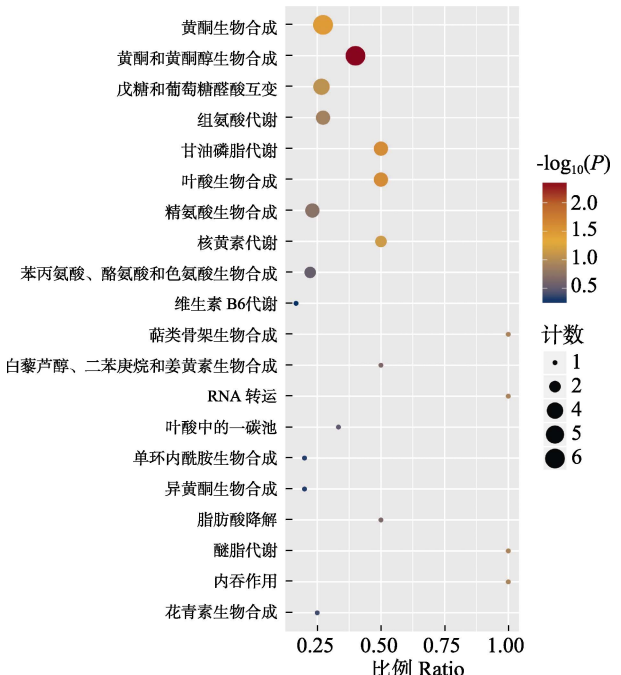


图 9 KEEG 富集气泡图
Fig. 9 KEEG enrichment bubble diagram

和黄酮醇的生物合成, 戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化。

3 讨论

倍性改变对植物的外观和内部结构产生显著影响。多倍体植物在形态学 (如更大的细胞、更厚的叶子、更长的木纤维)、生理学 (如更高的叶绿素含量和光合速率) 和生化 (如更高的次生代谢物、叶绿素和激素的含量), 均表现出具有农业意义的复杂性状 (如更高或更低的生长速率、耐旱性、抗倒伏性) [24-26]。本研究深入探讨了茶树倍性变化对其形态和生理特性的影响。利用流式细胞术和气孔观察技术确认了茶种种质资源中二倍体与三倍体的多样性, 并发现三倍体茶树在气孔长度、气孔宽度、气孔密度等方面的显著差异, 这些特征与多倍体植物的“巨大化”现象相吻合, 可能源于基因剂量效应 [27-29]。

在形态学上, 三倍体茶树展现出了较大的叶片和较长的叶柄, 这与多倍体植物的一般特征相符。此外, 三倍体茶树在物候期上表现为晚生, 这可能与其生长周期的延长有关, 从而在生长季节后期更好地适应环境, 提高茶叶品质。在农艺性状方面, 三倍体茶树的一芽二叶百芽重和叶面积显著高于二倍体, 这表明其具有更高的生物量积累能力, 可能与细胞体积增大和代谢活动增强有关 [10]。气孔结构方面, 三倍体茶树的气孔尺寸较大但密度较低, 这可能影响其光合效率和水分利用效率, 对栽培管理提出了新的要求 [30]。多倍体植物的基因组多倍化通常伴随着显著的代谢物变化。植物在基因组多倍化后, 其代谢和基因表达往往会发生显著变化, 亲缘关系的作用对于准确分析代谢物差异尤为关键 [31]。此外, 多倍体植物的代谢差异分析中, 母本与后代的比较是一种有效的方法, 有助于深入了解多倍体植物的代谢调控机制 [32]。

三倍体茶树表现出更大的叶面积和更高的一芽二叶百芽重, 这可能与其代谢活性增强有关。在三倍体中观察到的代谢物差异, 特别是次生代谢物如类黄酮和酚酸的增加, 可能是其更大的生物量和生物活性的分子基础。代谢组学分析显示, 三倍体茶树相较于二倍体, 显著增加了类黄酮类代谢物, 减少了某些氨基酸衍生物 (如 N-羟基-L-色氨酸)。类黄酮的增加可增强抗氧化活性 [33-34], 有利于抗病虫害和应对环境压力。而 N-羟基-L-

色氨酸的减少可能对植物防御机制产生影响^[35]。这些变化不仅提高了茶叶的抗氧化性能,也可能增强了其抗病虫害和环境适应能力。

三倍体生理和生化特征的变化,使三倍体茶树在特定环境或市场需求下更具优势。例如,增加的类黄酮含量可能提高茶叶品质,使其更适合于高附加值茶产品的生产。本研究结果进一步验证了倍性变化对茶树代谢物积累及其品质的显著影响。这种代谢优势为三倍体茶树提供了在茶叶品质改良中的潜力。

4 结论

本研究通过系统分析 165 份茶树样本,成功鉴定出 11 份三倍体茶树,展示了流式细胞仪在茶树倍性分析中的高效应用。研究表明,三倍体茶树与二倍体茶树在多项农艺性状和生理特性上存在显著差异,尤其在物候期、一芽二叶百芽重、叶面积以及叶形等方面。此外,三倍体茶树的某些生理和生化特性,如更大的叶面积和更高的一芽二叶百芽重,均表明其具有更高的生物量积累能力,这可能与细胞体积的增大和代谢活动的增强有关。此外,通过对三倍体西莲 1 号及其母本福鼎大白茶的代谢组学分析,我们发现了 1203 个差异代谢物,进一步揭示了倍性变化对茶树代谢轮廓的影响,其中类黄酮和酚酸的增加可能为三倍体茶树提供了更强的抗逆性和更优的品质特性。

这些发现不仅为茶树的基因评估和倍性杂交育种提供了重要的科学依据,也对优化茶树品种的育种策略和提高茶叶经济价值具有重要意义。未来的研究可以进一步探索三倍体茶树的其它经济性状及其在不同环境条件下的表现,以更好地利用这些优势特性,促进茶叶产业的可持续发展。

参考文献

- [1] 乔婷婷, 马春雷, 周炎花, 姚明哲, 刘饶, 陈亮. 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.
- [2] 黄海涛, 余继忠, 倪伯荣. 茶树多倍体育种研究进展[J]. 茶叶, 2006, 32(1): 14-17.
- [3] 刘青, 林开勤, 魏杰, 陈文军, 陈正武. 茶树多倍体育种研究进展与远景综述[J]. 分子植物育种, 2023, 21(4): 1272-1278.
- [4] LIU Q, LIN K Q, WEI J, CHEN W J, CHEN Z W. Summary of research progress and prospects on tea polyploid species[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(4): 1272-1278. (in Chinese)
- [5] LI Y M, YE T W, HAN C X, YE Z H, ZHANG J, XIAO S X, YUAN D Y. Cytogenetic analysis of interspecific hybridization in oil-tea (*Camellia oleifera*)[J]. Euphytica, 2021, 217(2): 1-12.
- [6] YU X M, XIAO J J, CHEN S, YU Y, MA J Q, LIN Y Z, LI R Z, LIN J, FU Z J, ZHOU Q Q, CHAO Q L, CHEN L, YANG Z B, LIU R Y. Metabolite signatures of diverse *Camellia sinensis* tea populations[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5586.
- [7] 朱道圩, 杨宵, 理莎莎, 符真珠, 毛俊. 流式细胞仪在果树作物倍性鉴定上的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6480-6482.
- [8] ZHU D W, YANG X, LI S S, FU Z Z, MAO J. Application of the flow cytometry in the identification of fruit ploidy[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(24): 6480-6482. (in Chinese)
- [9] COATE J E, CHEN J, MERU G. Artificial polyploidy in plants, volume ii[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13: 1124292.
- [10] 李斌, 陈兴琰, 陈国本, 王建国. 茶树染色体组型分析[J]. 茶叶科学, 1986(2): 7-14.
- [11] LI B, CHEN X Y, CHEN G B, WANG J G. Chromosome karyotyping analysis of tea plants[J]. Journal of Tea Science, 1986(2): 7-14. (in Chinese)
- [12] YAO X Z, QI Y, CHEN H F, ZHANG B H, CHEN Z W, LU L T. Study of *Camellia sinensis* diploid and triploid leaf development mechanism based on transcriptome and leaf characteristics[J]. PLoS One, 2023, 18(2): e275652.
- [13] CHEN J D, ZHENG C, MA J Q, JIANG C K, ERCISLI S, YAO M Z, CHEN L. The chromosome-scale genome reveals the evolution and diversification after the recent tetraploidization event in tea plant[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 63-68.
- [14] 王春梅, 唐茜. 崇州枇杷茶野生大茶树染色体核型分析[J]. 四川农业大学学报, 2012, 30(4): 419-423, 444.
- [15] WANG C M, TANG Q. Karyotype analysis of Chongzhou loquat wild tea plants[J]. Journal of Sichuan Agricultural

- University, 2012, 30(4): 419-423, 444. (in Chinese)
- [12] 江绘馨. 三倍体茶树表型、生理特性及转录组分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- JIANG H X. Physiological and transcriptome analysis of triploid tea plant varieties[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [13] 徐晓丹, 邵维助, 郑伟. 滇山茶多倍体栽培品种的细胞倍性[J]. 林业科学, 2018, 54(9): 44-48.
- XU X D, SHAO W Z, ZHENG W. Ploidy study on polyploidy cultivars of *Camellia reticulata*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(9): 44-48. (in Chinese)
- [14] 张虹, 路国栋, 赵帅, 林哲, 徐慧娟, 陈任. 利用流式细胞仪鉴定植物倍性的研讨[J]. 分子植物育种, 2020, 18(11): 3713-3717.
- ZHANG H, LU G D, ZHAO S, LIN Z, XU H J, CHEN R. Discussion on identification of plant ploidy by flow cytometry[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(11): 3713-3717. (in Chinese)
- [15] SAMARINA L, GVASALIYA M, KONINSKAYAN, RAKHMANGULOV R, EFREMOV A, KISELYOVAN, RYNDIN A, HANKE M. A comparison of genetic stability in tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] plantlets derived from callus with plantlets from long-term *in vitro* propagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 138: 467-474.
- [16] 熊文艳, 普冉, 刘云礼, 陈军文, 张敬丽. 基于流式细胞术对 27 种石斛的倍性鉴定和基因组大小分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(11): 2249-2257.
- XIONG W Y, PU R, LIU Y L, CHEN J W, ZHANG J L. Estimation ploidy and genome size of 27 *Dendrobium* species by flow cytometry[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(11): 2249-2257. (in Chinese)
- [17] 黄黎芳, 武志江, 梁桂东, 陆贵锋, 黄凤珠, 刘朝安, 邓海燕. 利用流式细胞术对 29 份火龙果种质染色体的倍性鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(4): 966-970.
- HUANG L F, WU Z J, LIANG G D, LU G F, HUANG F Z, LIU C A, DENG H Y. Ploidy determination of 29 pitaya germplasms using flow cytometry[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(4): 966-970. (in Chinese)
- [18] 张源源, 濮寿琴, 胡彦师, 方家林, 黄肖, 李维国, 黄华孙. 橡胶树种质资源的倍性鉴定[J]. 热带作物学报, 2020, 41(3): 457-463.
- ZHANG Y Y, PU S Q, HU Y S, FANG J L, HUANG X, LI W G, HUANG H S. Ploidy identification of germplasm resources in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Miill. Arg.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(3): 457-463. (in Chinese)
- [19] LIU Q L, LI X X, XU Y H, WANG L B, CHANG K L, YANG Y, TANG Q, TAN L. Analysis of inbreeding depression in the tea plant (*Camellia sinensis*) based on the self-compatible cultivar 'ziyan'[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 284: 110120.
- [20] NAUSHAD M, KHAN R M. Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry[M]. Abingdon: Taylor and Francis Group, 2014.
- [21] 中华人民共和国农业部. 茶树种质资源描述规范: NY/T 2943—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Descriptors for tea germplasm resources: NY/T 2943—2016[S]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2016. (in Chinese)
- [22] ELIZABETH J W, PERRINE MN, FILIPPOS M, IAN D W, G T, ROBERT S P, JOHN S, NEIL L, ELAINE H, JEREMY K N. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS[J]. Nature Protocols, 2012, 8(1): 17-32.
- [23] 刘振, 成杨, 赵洋, 杨培迪, 宁静, 杨阳. 基于代谢组学的湖南典型地方茶树种质资源代谢物差异研究[J]. 核农学报, 2022, 36(1): 83-93.
- LIU Z, CHENG Y, ZHAO Y, YANG P D, NING J, YANG Y. Metabonomics analysis of metabolic difference of Hunan tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] germplasm resources[J]. Journal of nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(1): 83-93. (in Chinese)
- [24] MCCONNAUGHAY K, COLEMAN J S. Biomass allocation in plants: ontogeny or optimality? A test along three resource gradients[J]. Ecology, 1999, 80(8): 2581-2593.
- [25] CHEN J, COATE J E, MERU G. Editorial: artificial polyploidy in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 621849.
- [26] 赵奉彬, 尚策, 张莉梅, 张志翔. 11 种杨属植物的倍性鉴定及山杨天然三倍体的发现[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(6): 23-27.
- ZHAO F B, SHANG C, ZHANG L M, ZHANG Z X. Ploidy testing of 11 poplar species and discovery of natural triploid *Populus davidiana* Dode[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 44(6): 23-27. (in Chinese)
- [27] KARASAWA K. On triploid thea[J]. Shokubutsugaku Zasshi, 1932, 46(547): 458-460.
- [28] QI Y, YAO X Z, ZHAO D G, LU L T. *De novo* characterization of the *Camellia sinensis* transcriptome and comprehensive analysis of the diploid and triploid leaf morphology and physiological differences[J/OL]. Preprint from Research Square, (2019-10-23)[2024-10-01]. <https://www.researchsquare.com/article/rs-7008/v1>.
- [29] QI Y, YAO X Z, ZHAO D G, LU L T. *De novo* characterization of the *Camellia sinensis* transcriptome and comprehensive analysis of the diploid and triploid leaf morphological

- differences[J/OL]. Preprint from Research Square, (2020-04-08)[2024-10-01]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-20102/v1>.
- [30] CHAEIKAR S S, MARZVAN S, KHIAMI S J, RAHIMI M. Changes in growth, biochemical, and chemical characteristics and alteration of the antioxidant defense system in the leaves of tea clones (*Camellia sinensis* L.) under drought stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 265: 109257.
- [31] COATE J E, DOYLE J J. Divergent evolutionary fates of major photosynthetic gene networks following gene and whole genome duplications[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(4): 594-597.
- [32] DUFRESNE F, STIFT M, VERGILINO R, MABLE B K. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(1): 40-69.
- [33] HUANG H, YAO Q, XIA E H, GAO L Z. Metabolomics and transcriptomics analyses reveal nitrogen influences on the accumulation of flavonoids and amino acids in young shoots of tea plant (*Camellia sinensis* L.) associated with tea flavor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(37): 9828-9838.
- [34] SINGH K, RANI A, KUMAR S, SOOD P, MAHAJAN M, YADAV S K, SINGH B, AHUJA P S. Early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase, exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*)[J]. *Tree Physiology*, 2008, 28(9): 1349-1356.
- [35] GONG X J, LI L Y, QIN L, HUANG Y B, YE Y L, WANG M, WANG Y, XU Y Q, LUO F, MEI H L. Targeted metabolomics reveals impact of n application on accumulation of amino acids, flavonoids and phytohormones in tea shoots under soil nutrition deficiency stress[J]. *Forests*, 2022, 13(10): 1629.