

本山茶与勐库茶疑似杂交后代的 RAPD 鉴定

陈文雄¹, 季鹏章^{1,2}, 黄兴奇², 张俊², 唐一春²

(1. 云南大学 生命科学院, 云南 昆明 650091; 2. 云南省农业科学院 茶叶研究所, 云南 勐海 666201)

摘要:应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记技术, 对云南临沧白莺山的 8 个茶树植株进行了亲缘关系鉴定。筛选出的 19 个 RAPD 引物在疑似双亲本山茶和勐库茶中, 分别能扩增出 28 和 20 条各自的特异条带。通过特异条带在疑似杂交后代的表现数量、表现率及聚类树状图两方面的分析, 可能的推测是: 黑条子茶、二嘎子茶可能是本山茶在长时间的历史过程中发生较大变异的产物; 白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶可能是本山茶与勐库茶自然杂交获得的 F1 代后又经混交, 经数代繁衍后形成的产物。

关键词: 茶树; RAPD; 杂交后代鉴定
中图分类号: S 793.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)10—0153—03

白莺山位于云南省临沧云县漫湾镇大丙山(主峰海拔 2 834 m)中部 东经 100°19′~100°20′, 北纬 24°17′~24°39′, 茶树分布于海拔 1 800~2 300 m 之间, 南北纵距 6 000 m, 东西横距 1 600 m。白莺山古茶园分布在 827 hm² 山地和村落中, 目前仍保留自生、半野生和人工栽培古茶树 180 多万株。白莺山古茶树类型多样, 在茶树分布较为集中的范围内发现有多形态特征差异显著的茶树类型, 当地居民俗称本山茶、贺庆茶、勐库茶、二嘎子茶、白芽子茶、黑条子茶、豆蔻茶、红芽口茶、柳叶茶和藤子茶等^[1]。白莺山古茶树资源分布较为集中, 规模大, 栽培时间长, 显示了茶树从野生型到栽培型的

进化过程, 是茶叶栽培史的缩影, 是开展茶树起源与演化研究的天然实验基地 对进一步研究我国茶树的起源、演变及滇西南少数民族对茶树的引种、驯化和种质创新都具有重要的价值。

DNA 随机扩增多态性标记(RAPD)是一种共显性分子标记, 已较多的应用在茶树的亲子鉴定^[2]、品种识别^[3]、连锁遗传图谱构建^[4] 以及茶树品种资源的评价^[5] 等方面。研究材料共 8 份 5 个品种, 均采自白莺山古茶园, 从形态学判断和分类 样品本山茶属大理茶(*C. taliensis*), 勐库茶属阿萨姆茶(*C. sinensis* var. *assamica*), 白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶 3 份样品形态特征

表 1 各样品的分类及主要形态特征

样品俗名	种和变种	主要形态特征
本山茶	大理茶 <i>C. taliensis</i>	树型乔木, 树姿直立 分枝密度中 叶长宽 10.6(9.6)×4.6(4.9), 叶色绿 腊层明显, 厚, 叶基楔形 叶背、主脉、叶柄、芽叶均无茸毛, 侧脉 8~10 对。花冠 6.5×6.6 花白、质地厚, 花瓣数 11
勐库茶	阿萨姆茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	小乔木, 半批张 分枝密; 小枝、叶背沿中脉和叶柄被柔毛且宿存; 叶片宽大、薄革质 先端渐尖, 子房有毛白芽子茶
白芽子茶		树型乔木, 树姿直立 分枝密度密 叶长宽 10(7.2)×4.2(4.1), 叶色深绿, 腊层明显 厚脆, 叶面平 叶基楔形, 叶背、主脉、叶柄、芽叶均有茸毛, 侧脉 7~9 对。花冠 2.6×2.7 花白含绿、质地厚 花瓣数 8~9 柱头 4 深裂, 花柱长 1.2 子房有毛
黑条子茶		树型乔木, 树姿直立 分枝密度密 叶长宽 15.5(12.3)×6.7(4.9), 叶色深绿, 叶面隆 叶基楔形, 叶背、主脉、芽叶均有茸毛, 叶柄茸毛少, 侧脉 12~13 对。花冠 3.3×3.6 花白 花瓣数 7; 柱头 3 浅裂, 花柱长 1.1, 子房有毛
二嘎子茶		树型小乔木, 树姿半开张, 分枝密度中(主干 5 枝), 叶长宽 15.1(7.1)×6.9(6.1), 叶色绿 腊层明显, 厚 叶面微隆叶基楔形, 叶背、主脉、叶柄、芽叶均有少量茸毛, 侧脉 8~10 对。花冠 5.8×5.6 花白、质地厚 花瓣数 8 柱头 4~5 浅裂, 花柱长 1.6 子房有毛

第一作者简介: 陈文雄(1982-), 男, 云南楚雄人, 硕士, 现从事茶树分子生物学研究工作。
通讯作者: 黄兴奇。E-mail: xingqih@hotmail.com。
基金项目: 云南省应用基础研究计划重点资助项目(2006C0012Z)。
收稿日期: 2008—04—23

介于本山茶与勐库茶之间。从种植区域和历史以及形态特征推测, 本山茶和勐库茶可能作为原始亲本, 其余材料是两亲本通过自然杂交以及多代繁衍的杂交后代。为验证上述推测, 理清各材料之间的遗传关系和背景, 同时为该古茶园的茶树品种分类提供依据, 现拟用 RAPD 标记技术对这些茶树品种的遗传关系作一定的分析和探讨, 以期对白莺山古茶园的种质资源的鉴定和

保护工作提供借鉴和参考。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂、仪器

材料: 采自白莺山古茶园的 8 份茶树材料, 其中白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶各 2 份, 均采自不同的单株, 用硅胶干燥, 保存到 4℃处直至提取 DNA。凭证标本保存在云南省农科院茶叶研究所标本室。各样品主要形态特征见表 1。

试剂及仪器: PCR 反应所需的 Taq polymerase、dNTP 和 RAPD primers(上海生工), PCR 仪 (PTC-200, MJ Research), 电泳仪, 紫外成像系统等。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取方法参照陈亮等^[9]的方法加以改进。紫外分光光度法测定基因组 DNA 浓度, 稀释到 50 ng/μL 备用。

1.2.2 PCR 扩增及琼脂糖电泳 参照陈亮等^[7]的方法

并加以优化。

1.2.3 数据处理及分析方法 RAPD 产物按条带的有无分别赋值, 有带记为 1, 无带记为 0。统计并分析本山茶及勐库茶各自特异条带在疑似杂交后代中的表现数量及表现率; 采用 Nt sys-pc 2.0 分析软件, 根据供试样品的 Jaccard 遗传相似系数矩阵, 构建 UPGMA 聚类树。

2 结果与分析

2.1 特异条带在疑似杂交后代的表现数量分析

从 100 个 RAPD 引物中筛选出 19 个能够以本山茶与勐库茶相互为对照、获得各自特异条带的 RAPD 引物。扩增图谱中本山茶有 28 条特异条带, 勐库茶有 20 条特异条带。2 个样品各自的特异条带在其余 6 个样品中表现的条带数及表现率见表 2。可以看出, 在白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶都较多的表现了本山茶的特异条带, 其中白芽子茶表现的条带最多。另外, 白芽子茶也表现出较多的勐库茶特异条带。

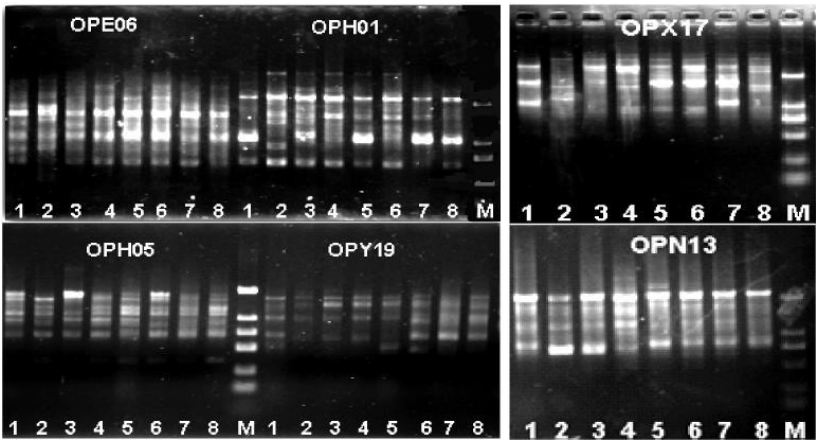


图 1 引物 OPE06 OPH01, OPH05, OPN13 OPX17 和 OPY19 的扩增图谱
注: 1~8 分别为: 本山茶、勐库茶、白芽子茶 1、白芽子茶 2、黑条子茶 1、黑条子茶 2、二嘎子茶 1、二嘎子茶 2; M: Marker-DL2000。

2.2 聚类分析

从 100 个 RAPD 引物中筛选出个 22 个能够获得清晰条带、反应稳定的 RAPD 引物, 共扩增到 112 条条带, 条带的分子量在 300~3 000 bp, 其中共有带 33 条, 多态性条带 79 条。

通过构建的 8 个茶叶样品的 UPGMA 聚类图 (图 1), 可以看出, 供试的白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶 3 个品种各自相同的两份材料, 都有非常高的遗传相似性 (相似系数分别为 0.9048、0.8723、0.8372)。这在一定程度证实了 RAPD 技术应用于亲缘关系分析的准确性。由图 1 得出, 白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶与本山茶的亲缘关系较近, 三者 (各包括两份同一品种样品) 与本山茶的平均相似系数分别为: 0.5538、0.5082 和 0.4702。黑条子茶、二嘎子茶与勐库茶的平均相似系数只有 0.2699 和 0.2593, 说明它们与勐库茶的亲缘关系较远。另外, 白芽子茶与勐库茶的平均相似系数为 0.4206, 较黑条子茶和二嘎子茶高, 表明其与勐库茶的亲缘关系近。

表 2 本山茶与勐库茶各自特异条带在 6 样品中的表现数及表现率

样品	样品表现的本山茶特异条带数及表现率		样品表现的勐库茶特异条带数及表现率	
	特异条带数	表现率/ %	特异条带数	表现率/ %
白芽子茶 1	24	85.7	15	75.0
白芽子茶 2	23	82.1	14	70.0
黑条子茶 1	22	78.6	7	35.0
黑条子茶 2	20	71.4	9	45.0
二嘎子茶 1	20	71.4	7	35.0
二嘎子茶 2	19	67.9	6	30.0

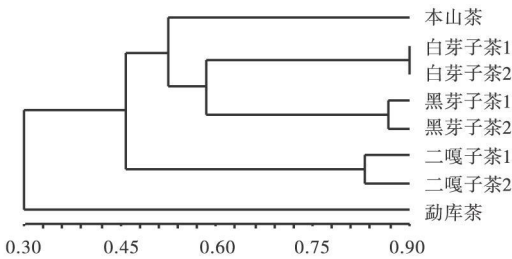


图 2 供试样品的 UPGMA 聚类树

3 讨论

综合以上分析,可能的推测是:黑条子茶、二嘎子茶可能是本山茶在长时间的历史过程中发生较大变异的产物;白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶可能是本山茶与勐库茶自然杂交获得的 F1 代后又经混交,经数代繁衍后形成的产物。

茶组植物是异花授粉植物,长期杂交演化的结果,产生大量的不连续变异,在无严格生殖隔离的情形下,其遗传背景趋于复杂,茶树的自然繁衍和人为增殖又都藉助于种子,所以通常的农家品种及野生茶树是一个异质性很强的群体^[8]。因而自然生长状态下的茶树极有可能是多个亲本杂交、串交后的产物。该试验中,疑似亲本本山茶和勐库茶的特异 RAPD 条带在白芽子茶、黑条子茶和二嘎子茶中都未能全部表现出来,这也验证了上述观点。

田中淳一、梁月荣等利用 RAPD 技术对“丰绿”、“茗

绿”、“开炉”、“晚绿”等自然杂交材料进行了亲本鉴定,因 RAPD 标记表现共显性,从而肯定了 RAPD 标记技术在茶树亲子鉴定中的有效性^[3,9-10]。在试验中,由于供试材料的遗传关系无明确记录,都为当地的农家栽培品种、遗传背景较为复杂,且疑似亲本与杂交后代之间没有严格意义上的直接杂交繁衍关系,因而单纯利用 RAPD 标记对它们的亲缘关系无法做出确定的鉴定结论,还需利用其它的标记分析手段对它们的亲缘关系作进一步的研究。

参考文献

[1] 唐一春,王平胜.云南云县白莺山古茶资源考察[J].中国茶叶,2007(5):12.
[2] 田中淳一,山口聪.应用 RAPD 法对茶叶品种的识别和亲子鉴别[J].育种学杂志,1995,45(1):241.
[3] 梁月荣,田中淳一,武田善行.应用 RAPD 分子标记分析“晚绿”品种的杂交亲本[J].茶叶科学,2000,20(1):22-26.
[4] 黄福平.茶树遗传多样性分析与遗传图谱构建[D].浙江大学博士学位论文,2005:12.
[5] 罗军武.茶树种质资源遗传亲缘关系及分类的 RAPD 分析[D].湖南农业大学博士学位论文,2001:28.
[6] 陈亮,陈大明,高其康.茶树基因组 DNA 提纯与鉴定[J].茶叶科学,1997,17(2):177-181.
[7] 陈亮,高其康,杨亚军.茶树 RAPD 反应系统和扩增程序优化[J].茶叶科学,1998,18(1):16-20.
[8] 虞富莲.茶树种质资源的研究现状及展望[J].中国茶叶,1990(2).
[9] 田中淳一,齐藤格久,山口聪.利用 RAPD 标记对茶树品种的识别[J].茶叶研究报告,1994,79(别册):32-33.
[10] 田中淳一,山口聪. Use of RAPD markers for the identification of parentage of tea cultivars [J]. 茶叶试验场研究报告,1996(9):31-36.

Parentage Identification of Suspicious Filial Generations from “BenShan Tea” and “MengKu tea” Using RAPD Marker

CHEN Wen-xiong¹, JI Peng-zhang^{1,2}, HUANG Xing-q², ZHANG Jun², TANG Yi-chun²

(1. College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China; 2. Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Menghai, Yunnan 666201, China)

Abstract: Parentage identification of 8 tea plants, which selected from BaiYing Mountain of LinCan, YunNan province, was carried out with RAPD method. There were 28 special bands of BenShan and 20 special bands of MengKu respectively from 19 primers. The special bands' number and express ratio of suspicious filial generations and DNA molecular dendrogram were analysed, the results showed that HeiTiaoZi and ErGaZi were variations progenies of BenShan and BaiYaZi, HeiTiaoZi and ErGaZi were progenies of F1, which derived from BenShan and MengKu.

Key words: Camellia sinensis; RAPD; Parentage identification