

文章编号: 0529-6579 (1999) 04-0072-05

可可茶种群分化及其与近缘种的亲缘关系^{*}

袁长春, 施苏华, 叶创兴

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 利用随机多态性 DNA (RAPD) 技术对茶 *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.、普洱茶 *C. assamica* (Mast.) Chang 和可可茶 *C. pitlophylla* Chang 含不同类型嘌呤生物碱 (含可可碱、含可可碱+咖啡碱、含咖啡碱) 的 3 个类群进行了分析. 选用 16 个引物 (10 bp) 扩增出 401 个 DNA 片段, 用于遗传相似性分析, 构建树系图. 分析结果表明: ① 可可茶种群可分为含可可碱和含可可碱+咖啡碱两个类群, 而含咖啡碱性状的类群应归并到茶 *C. sinensis* (L.) O. Ktze. 类; ② 可可茶含可可碱和含可可碱+咖啡碱两个类群之间亲缘关系较近, 来自同一起源, 后者可能是由于可可茶与近缘种杂交所致; ③ 可可茶与近缘种茶、普洱茶之间的亲缘关系较远, 支持将可可茶划分为一个独立种的观点.

关键词: 可可茶; 种群分化; RAPD; 亲缘关系

中图分类号: Q 949.758.4 **文献标识码:** A

可可茶 (*Camellia pitlophylla* Chang, 俗称毛叶茶) 是近年来新发现的野生茶树资源^[1], 在系统分类上属山茶属、茶亚属、茶组、茶系^[2], 和传统栽培的茶树茶 (俗称小叶茶, *C. sinensis* (L.) O. Ktze.)、和普洱茶 (俗称大叶茶, *C. assamica* (Mast.) Chang) 相比较, 可可茶的茶叶中的嘌呤生物碱成份为可可碱而非咖啡碱^[3], 药理作用^[4] 和生理效应^[5] 的研究表明, 可可茶可作为一种新的不含咖啡碱的茶叶资源. 在可可茶种群中, 大部分植株含可可碱为主, 但也存在一部分植株虽然形态特征上不能加以区分但却含咖啡碱为主. 因而对可可茶的引种驯化以及含可可碱性状稳定的母株的筛选带来困难. 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析具有简便、灵敏度高, 分析速度快、仅需微量的 DNA 即能获得丰富的多态性特征等优点, 已被广泛用于植物种属、品种鉴定及其分类和进化等方面的研究. 我们根据高压液相色谱分析的结果, 将从原生地移栽于中山大学茶园内的可可茶植株依所含嘌呤生物碱的不同分为含可可碱、含可可碱+咖啡碱、含咖啡碱 3 个类群. 并与近缘种茶和普洱茶相比较, 进行 RAPD 分析. 旨在为可可茶的分类和种群分化问题提供分子证据, 同时为可可茶资源的开发尤其是母株的筛选提供科学依据.

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (39570081, 39970057) 资助项目; 国家杰出青年基金 (39825104) 资助项目;

收稿日期: 1998-10-15 作者简介: 袁长春, 男, 1966 年生, 讲师.

1 材料和方法

1.1 材 料

茶、普洱茶及可可茶 3 个类群共 5 种植物材料来源及其所含嘌呤碱的类型见表 1，每个样品按 10 株采样，不够 10 株者按实有株数采样。

表 1 材料编号和来源

Tah 1 The number and sources of materials

编号	材 料	所含咖啡碱类型 ¹⁾	样品株数	采集地	采集号
1	<i>C. sinensis</i>	Caffein	10	中山大学茶园	98042102
2	<i>C. assamica</i>	Caffein	10	中山大学茶园	98042801
3	<i>C. pitlophylla</i> 1	Theobromine	10	中山大学茶园	98041901
4	<i>C. pitlophylla</i> 2	Theobromine+ Caffein	3	中山大学茶园	98041701
5	<i>C. pitlophylla</i> 3	Caffein	1	中山大学茶园	98041501

1) 资料来源于中山大学测试中心报告

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 采用 2×CTAB 法^[9]从 1.2~1.5 g 鲜叶中提取总 DNA。DNA 纯化按下列步骤进行：100 μL DNA 1×TE 溶液加入 3 倍体积的 6 mol/L NaI，7 μL 玻璃粉 TE 溶液，混匀，室温放置 5 min；8 000 r/min 离心 2 min，弃上清液；加洗脱液（含 0.2 mol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，1 mmol/L EDTA，φ 为 50%乙醇）200 μL，混匀，8 000 r/min 离心 2 min，弃上清液，重复洗脱 3 次；晾干，加 100 μL 1×TE；50 ℃保温 15~20 min 至沉淀完全溶解；10 000 r/min 离心 10 min，将上清液移至新管，弃沉淀，-20 ℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及产物的鉴定 扩增条件为 20 μL 反应体积，1×Taq 酶 buffer（华美生物工程公司），约每 μL 反应体积 4 ng 模板 DNA，2.0 mmol/L MgCl₂，200 μmol/L dNTP（华美生物工程公司）；Taq 酶 1 个单位（华美生物工程公司）；0.75 ng/μL 引物（Sangon 公司）。空白对照用三蒸水代替模板 DNA，其余成分不变。在 PTC-100 型 PCR 仪（MJ Research Inc.）上按下列程序进行扩增：94 ℃ 4 min，1 个循环；94 ℃ 1 min，35 ℃ 2 min，72 ℃ 2 min，45 个循环；72 ℃ 7 min 1 个循环，结束。PCR 扩增反应均重复 1 次。PCR 扩增完成后，取 17 μL 扩增产物点样于 φ 为 1.4% 琼脂糖凝胶上，在 1×TAE 缓冲液中电泳，稳压（4 V/cm），电泳约 3.5 h，2 000 bp ladder DNA（中山大学生物工程中心产品）用作相对分子质量标记。凝胶在 0.5 μg/mL EB（溴化乙锭）中染色约 40 min，紫外光下检测和照像。在电泳图谱上同一 RAPD 位点有带者（包括强带和弱带）记作 1，缺乏记作 0，选取长度在 200~2 200 bp 并且可重复的 DNA 带记录待分析。

1.2.3 随机引物的筛选 对 100 条 10 个核苷酸长的随机引物（Sangon 公司产品）进行筛选。仅选用能得到清晰扩增带，对照无假带或假带弱，加总 DNA 后这些假带消失的引物，共筛选出 16 条（见表 2）进行正式扩增。

2 结 果

采用 16 个引物对 5 个分类群的总 DNA 进行扩增，共得到 401 条可区分的 DNA 带，最多的在引物 S41 共获得 32 条带，最少的在引物 S17 共获得 17 条带，该 16 个引物在每个样

表 2 RAPD 扩增引物及其序列

Tah 2 The primes used for RAPD

引物	序列（5′—3′）	引物	序列（5′—3′）	引物	序列（5′—3′）
S17	AGGGAACGAG	S43	GTGCCGTCA	S64	CCGCATCTAC
S21	CAGGCCCTTC	S48	GTGTGCCCCA	S71	AAAGCTGCGG
S28	GTGACGTAGG	S57	TTTCCCA CGG	S85	CTGAGACGGA
S31	CAATGCGCT	S59	CTGGGACTT	S91	TGCCCGTCGT
S35	TTCCGAACCC	S60	ACCCGGTCAC	S216	GGTGAACGCT
S41	ACCGCGAAGG				

品中扩增的片段总数平均为 80 条，其中引物 S35 和 S91 的扩增结果见图 1。

每一 DNA 片段被看作一个可区分的分子标记，采用 Jaccard 相似性系数公式计算遗传相似程度，遗传距离采用下列公式计算^[8]： $D=1-F$ ， $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$ ， D 为遗传距离， F 为 Czekanowski 相似性系数， N_{xy} 为样品 x 和样品 y 二者共有的 RAPD 带数， N_x 为样品 x 的 RAPD 带总数， N_y 为样品 y 的 RAPD 带总数。计算结果见表 3。

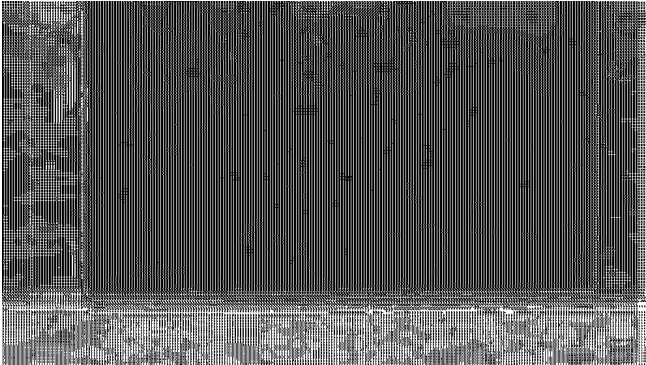


图 1 由引物 S35 (a) 和引物 S91 (b) 扩增产生的 RAPD 带

Fig 1 RAPD bands generated by primer S35 (a) and S91 (b)
图上面的数字代表的材料见表 1。M：2 000 bp ladder DNA Marker

表 3 5 个类群间 Jaccard 相似性系数（左下部）和遗传距离（右上部）

Tah 3 Jaccard coefficient of similarity (below the diagonal) and genetic distance coefficient (above the diagonal) between any two taxa

编号	材料	1	2	3	4	5
1	<i>C. sinensis</i>	—	0.413 0	0.523 2	0.636 4	0.258 1
2	<i>C. assamica</i>	0.415 4	—	0.497 0	0.635 1	0.396 0
3	<i>C. ptilophylla</i> 1	0.313 0	0.336 0	—	0.339 1	0.491 1
4	<i>C. ptilophylla</i> 2	0.222 2	0.223 1	0.493 5	—	0.546 7
5	<i>C. ptilophylla</i> 3	0.589 7	0.432 6	0.341 3	0.293 1	—

用 UPGMA 法对所求得的遗传距离进行聚类分析，得到一树状分枝图（见图 2）。

3 分 析

由图 2 和表 3 可知，可可茶中含咖啡碱的类群与茶（*C. sinensis*）二者之间的 Jaccard 相似性系数高达 0.589 7，遗传距离为 0.258 1。Buren 等^[8]用 RAPD 方法研究 *Ranunculus acriformis* var. *aestivalis* 与几个同属近缘种的关系，种间的最大 Jacard 相似性系数为 0.473，

变种间最小的 Jaccard 相似性系数为 0.520. Kazan 等^[9]用 RAPD 标记研究几个 *Stylosanthes* 种的遗传变异, 种间最小的遗传距离为 0.290. 若参考以上报道, 可可茶中含咖啡碱的类群属于茶类而非可可茶类, 实地观察亦发现该类群植株的叶明显小于其它可可茶植株的叶, 且前者叶的厚度和被毛程度也明显不及后者.

由图 2 还可知, 可可茶种群可分为含可可碱和含可可碱+咖啡碱两个类群. 二者间 Jaccard 相似性系数为 0.493 5, 遗传距离为 0.339 1 (见表 3), 亲缘关系较近, 且从外形上难以区分^[3], 因而两个类群具有相同起源, 结合可可茶可可碱的合成受遗传基因控制而非环境条件所致^[9], 因而引起种群分化的原因可能是其与近缘种杂交.

在形态特征上, 可可茶和茶、普洱茶接近, 子房 3 室被毛, 但前者叶极长大, 长宽最大可达 27 cm×6.8 cm, 而且叶的毛被长而密, 花果均较茶和普洱茶大^[1], 因而将其作为一个独立的种归入到茶组茶系^[2]. 且可可茶 *C. pitlophylla* Chang 分布狭窄, 目前仅发现于广东从化和龙门两县接壤的局部地区, 抑或作为茶或普洱茶之变种或品种更为合适. RAPD 分析结果显示: 可可茶两个类群与茶、普洱茶的亲缘关系较远, 彼此间的 Jaccard 相似性系数在 0.22~0.34 之间, 遗传距离 0.49~0.64 之间 (见表 3). 若参考文 [8, 9] 及形态学上分类特征, 不将可可茶处理为茶或普洱茶之变种或品种, 而处理为一个独立种较为合适.

综上所述, 可可茶作为一个独立的种, 其可可碱的合成受内在遗传因素控制, 具有相对稳定性, 但可能由于与近缘种杂交的结果, 导致种群分化, 且这种分化从外形上难加以区别. 因此, 引种驯化可可茶, 应先对母株进行嘌呤生物碱检测, 然后选择含可可碱而不含咖啡碱的可可茶植株作为母株.

参考文献:

- [1] 张宏达, 叶创兴, 张润梅, 等. 中国发现新的茶叶资源——可可茶 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1988 (3): 131~133.
- [2] 《张宏达文集》编写组. 张宏达文集 [M]. 广州: 中山大学出版社, 1995. 284~296.
- [3] 叶创兴, 林永成, 周海云, 等. 可可茶嘌呤生物碱的分离和分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1997, 36 (6): 30~33.
- [4] 许实波, 王向谊, 郭文成, 等. 毛叶茶提取物的药理作用 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1990, 29 (增刊): 185~189.
- [5] 许实波, 何兆兴, 冯建林, 等. 毛叶茶提取物的急性毒性、降血压和心脏生理效应的研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1990, 29 (增刊): 178~184.
- [6] DOYLE J J. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15.
- [7] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990. 35~81.
- [8] BUREN R V, HARPER K T. Evaluation the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acriformis*

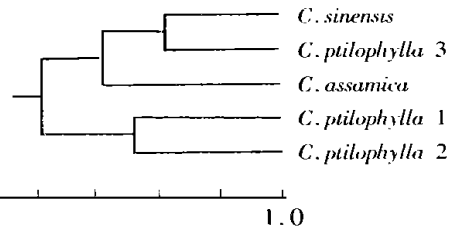


图 2 用遗传距离分析产生的树状分歧图

Fig 2 Dendrogram generated using UPGMA algorithm to cluster the genetic distances

- var. *aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA [J] . American J Botany, 1994, 81 (4): 514~519.
- [9] KAZAN K, MANNERS J M, CAMERON D F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers [J] . Theor Appl Genet, 1993, 85: 882~888.
- [10] 叶创兴, 刘称心, 张润梅. 可可茶易地移植后可可碱的变化 [J] . 中山大学学报 (自然科学版), 1996, 35 (增刊 2): 58~60.

Phylogentic Relationship of *Camellia ptilophylla* Chang with Its Allied Species and Disintegration of Its Population

YUAN Chang-chun^{*}, SHI Su-hua, YE Chuang-xing

Abstract: *Camellia ptilophylla* Chang was divided into three demes; *C. ptilophylla* 1 (containing theobromine), *C. ptilophylla* 2 (containing theobromine+caffeine) and *C. ptilophylla* 3 (containing caffeine). The three demes and *C. sinensis* (L.) O. Ktze., *C. assamica* (Mast.) Chang were analysed, using random amplified polymorphic DNA (RAPD) genetic markers. Sixteen oligonucleotide primers of arbitrary sequence (10 bp) were selected for DNA amplification, generating 401 RAPD bands were used for the analysis of genetic similarity. The dendro-gram was constructed by using UPGMA method from the Phylip3.752c programs based on the RAPD data. The result shows that: ① *C. ptilophylla* Chang only can be divided into two demes of containing theobromine and containing theobromine+caffeine. The deme of containing caffeine should return to the *C. sinensis* (L.) O. Ktze. ② The deme of containing theobromine and the deme of containing theobromine+caffeine are closely related, the both have the same origin, and the latter may result from the hybridization between *C. ptilophylla* and its allied species. ③ There is a far genetic distance between *C. ptilophylla* and *C. sinensis* or *C. assamica*. Therefore, the opinion that *C. ptilophylla* must be a independent species can be supported by the result of RAPD analysis.

Keywords: *Camellia ptilophylla* Chang; disintegration of population; RAPD; phylogentic relationship

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China