

云南大理茶与福鼎大白茶种间杂交幼胚的组织培养及亲子鉴定

刘本英¹, 周 健¹, 许 玫², 唐一春², 王丽鸳¹, 成 浩^{1*}, 张小飞¹, 王平盛²

(¹ 中国农业科学院茶叶研究所, 农业部茶叶化学工程重点开放实验室, 杭州 310008; ² 云南农业科学院茶叶研究所, 云南勐海 666201)

摘 要: 为解决茶树种间杂交不亲和及 F₁ 代生长发育困难等问题, 在云南大理茶 [*Camellia taliensis* (W. W. Smish) Melchior] 与福鼎大白茶 (*C. sinensis* 'Fuding Dabaicha') 间进行了种间杂交试验, 随机选取 9 个 F₁ 代杂种幼胚进行了组织培养, 其余杂种田间播种, 获得福鼎大白茶 (♀) × 云南大理茶 (♂) 杂交组合的 3 个幼胚组培苗株系, 而播种的萌芽率为零。应用简单重复区间序列 (ISSR) 分子标记技术对 F₁ 代组培苗进行了亲子鉴定, 其中 15 个随机引物在第 1 株杂交后代 (F₁-1) 中共扩增出 283 条 ISSR 谱带, 包括能在双亲中检出的 275 条和 F₁-1 自身的特异带 8 条。在第 2 株杂交后代 (F₁-2) 中有 282 条谱带能在双亲中检出, 在第 3 株杂交后代 (F₁-3) 中有 288 条谱带能在双亲中检出。卡平方检验表明, 在 F₁-1、F₁-2 及 F₁-3 中扩增出的谱带数与亲本中各对应位点所显示的谱带数之间没有显著差异。ISSR 鉴定结果证实了杂种的真实性。

关键词: 茶; 云南大理茶; 福鼎大白茶; 种间杂交; 幼胚组培; 亲子鉴定

中图分类号: S 571.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 05-0735-06

Tissue Culture of Immature Embryo and Parentage Identification of Hybrids Between *Camellia taliensis* (W. W. Smish) Melchior and *C. sinensis* 'Fuding Dabaicha'

LIU Ben-ying¹, ZHOU Jian¹, XU Mei², TANG Yi-chun², WANG Li-yuan¹, CHENG Hao^{1*}, ZHANG Xiao-fei¹, and WANG Ping-sheng²

(¹ Key Laboratory of Tea Chemical Engineering, Ministry of Agriculture, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China; ² Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Menghai, Yunnan 666201, China)

Abstract: In order to solve the problems of interspecies cross in tea plants, such as hybrid incompatibility and the growth difficulty of filial generations, interspecific hybridization was carried out between 'Yunnan Dalicha' [*Camellia taliensis* (W. W. Smish) Melchior] and 'Fuding Dabaicha' (*C. sinensis*), immature embryos of nine hybrids selected randomly were cultured, and other hybrids were cultured by seeding method. Three tissue culture plantlets of immature embryo were obtained with selecting 'Yunnan Dalicha' as male parent and 'Fuding Dabaicha' as female parent, but germination rate of other hybrids in the field was zero. Parentage identification of filial generation tea plants, which derived from tissue culture of immature embryos of 'Yunnan Dalicha' and 'Fuding Dabaicha' by artificial hybrid method, was carried out with ISSR method. There were 283 bands in which 275 bands were same as their male parent or female parent and 8 bands did not appear in their parents in F₁-1 from 15 primers, 282 same bands as their parents in F₁-2, and 288 same

收稿日期: 2008-01-02; 修回日期: 2008-04-08

基金项目: 国家科技基础条件平台建设计划项目 (2005DKA21002); 浙江省重点科技计划项目 (2006C22070)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chenghao@mail.tricaas.com)

bands as their parents in F_1 -3. There were not significant difference among bands between F_1 -1 (F_1 -2 or F_1 -3) and their parents in the same position by χ^2 test. ISSR analysis showed that they were really hybrids.

Key words: tea; *Camellia taliensis* (W. W. Smish) Melchior; *C. sinensis* 'Fuding Dabaicha'; interspecific hybridization; tissue culture of immature embryo; parentage identification

茶树组织培养始于 19 世纪 80 年代, 近几年国外研究者 (Indra et al., 2001; Mondal, 2003) 对茶树的组培体系进行了研究, 国内研究主要集中在叶片、子叶、茎段、腋芽等器官培养上。

福鼎大白茶 (*Camellia sinensis* 'Fuding Dabaicha') 又名 '白毛茶' (白堃元, 2001), 与云南大理茶 [*C. taliensis* (W. W. Smish) Melchior] 属于茶组植物不同的种, 福鼎大白茶育芽力和持嫩性强, 抗旱性较强, 抗寒性强。而云南大理茶的显著特点是茶多酚含量高, 如大理茶中的弄岛野茶茶多酚含量超过 40% (王平盛和虞富莲, 2002), 但抗性较差。因此, 将福鼎大白茶与云南大理茶杂交, 从后代中选育出高产、优质、高抗红茶新品种具有重要意义。国内已有关于福鼎大白茶与云南大叶茶杂交的报道 (黎星辉 等, 2001; 叶乃兴 等, 2004)。本课题组利用云南大理茶与福鼎大白茶杂交获得的杂交幼胚进行组织培养, 培育 F_1 代杂种组培苗, 旨在寻求解决茶树远缘杂交育种困难的技术方法, 并通过 ISSR 技术手段对杂交后代进行遗传分析和鉴定, 从而为培育优质的茶树杂交品种提供分子理论依据, 探讨茶树品种性状早期预测的可能性。

1 材料与方法

1.1 杂交授粉

2004 年 11 月中旬在云南农业科学院茶叶研究所茶树种质资源圃进行云南大理茶和福鼎大白茶种间正反杂交人工授粉, 用蒙导法共授粉 329 朵, 于 2005 年 4 月 25 日和 7 月 2 日统计坐果率, 除少部分于 2005 年 7 月采集幼胚进行组培外, 其余于 2005 年 11 月采集播种于云南茶叶研究所资源圃内。

1.2 杂交幼胚组织培养

杂交幼胚组培在中国农业科学院茶叶研究所组织培养实验室进行。2005 年 7 月中旬采集杂交种子, 取其幼胚进行组培, 将杂交种剥开果核 (不伤种皮) 取出种子, 洗净后用洗洁精溶液浸泡 1 h, 再用流水冲洗 1 h 以上, 于超净工作台上置于消毒烧杯中, 先用 70% 酒精灭菌 1 min, 再用 1% $HgCl_2$ 灭菌 10 min (加 2~3 滴吐温-80), 然后用无菌水浸泡冲洗 6 次以上, 最后在超净工作台上剥去种皮, 将胚接入培养基中。

采用本实验室 $MS + BA 1.0 mg \cdot L^{-1} + KT 1.0 mg \cdot L^{-1} + IBA 0.1 mg \cdot L^{-1} + GA_3 1.0 mg \cdot L^{-1}$ 萌发培养基, 在萌发后继代 2~3 次转接到培养基 $MS + BA 2.0 mg \cdot L^{-1} + NAA 0.1 mg \cdot L^{-1} + GA_3$ 中促进其快速增殖和成苗。

1.3 基因组的提取和检验

6 月采集福鼎大白茶 (♀)、云南大理茶 (♂) 的新鲜一芽三叶和福鼎大白茶 (♀) × 云南大理茶 (♂) 杂交幼胚培养的 F_1 代组培苗 3 株 (F_1 -1、 F_1 -2、 F_1 -3) 提取基因组 (刘本英 等, 2006)。

1.4 ISSR-PCR 分析

参照刘本英等 (2006) 的反应体系, 在 PTC-200 型 PCR 仪 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) 上扩增。10 μL 反应体系成分包括: 40 ng $\cdot \mu L^{-1}$ 模板 DNA 1.0 μL 、10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 引物 0.4 μL 、10 × PCR Reaction buffer 1.0 μL 、25 mmol $\cdot L^{-1}$ Mg^{2+} 0.8 μL 、10 nmol $\cdot L^{-1}$ dNTP 0.2 μL 、Tag DNA polymerase (5 units $\cdot \mu L^{-1}$) 0.1 μL 、ddH₂O 6.5 μL 。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min; 52~60 $^{\circ}C$ 不等退火 30 s; 72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min, 共 39 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min。扩增 PCR 产物 4 $^{\circ}C$ 保存。ISSR-PCR 产物电泳和检测: 在 1 × TBE 缓冲液中, 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产

物, 电压设定为 150 V, 电泳 4 h。银染显色, Bio-Rad 凝胶成像仪拍照记录。

2 结果与分析

2.1 不同杂交组合坐果率和杂种培养成活率的差异

不同的杂交组合, 坐果率差异明显。第 1 次坐果率统计表明: 以福鼎大白茶为父本的坐果率是 25.8%, 而以福鼎大白茶为母本的坐果率是 32.2%。第 2 次的坐果率统计显示: 以福鼎大白茶为父本的坐果率是 8.6%, 而以福鼎大白茶为母本的坐果率是 16.5%。由于结实率低, 只获得福鼎大白茶 (♀) × 云南大理茶 (♂) 39 个杂种种子和反交 8 个杂种种子, 总共有前者 9 个杂种幼胚进行了组培, 获得了 3 个胚组培苗株系; 其余 38 个种子成熟后播种培养, 但萌芽率为零。

2.2 杂交幼胚组织培养

杂交幼胚组培的结果表明, 本试验采用的萌发生长培养基和继代增殖培养基能很好地促进幼胚快速增殖和成苗。福鼎大白茶 (♀) × 云南大理茶 (♂) 杂种总共接种 9 个, 其中 3 个经培养后萌发生长, 幼胚每次继代时间为 30 d, 经过 3 次继代后 (自培养日起 120 d) 获得了 47 株可移栽小苗 (株高 5 cm 以上), 并且经过进一步的继代培养, 3 个胚组培苗实现了稳定增殖和生长 (表 1)。

表 1 3 个杂交胚萌发后继代增殖的苗数

Table 1 Mature plantlet amount of proliferation of three crossbred seeds after germinated

杂交胚 Crossbred seeds	30 d	60 d	90 d	120 d
F ₁ -1	1	3	5	28
F ₁ -2	1	3	5	11
F ₁ -3	1	1	3	8
合计 Total	3	7	13	47

2.3 ISSR-PCR 扩增分析

从 Sangon 公司合成的 40 个引物中筛选出多态性较好的 15 个引物 (表 2), 对云南大理茶 (♂)、福鼎大白茶 (♀) 以及 3 个 F₁ 代单株 (F₁-1、F₁-2、F₁-3) 进行扩增, 扩增结果如表 2 所示。

F₁-1 共扩增出 283 条谱带, 其中在双亲扩增位点中均可检出的谱带 159 条, 占谱带总数 56.18%, 单独在父本扩增位点检出的谱带 35 条, 占谱带总数 12.37%, 单独在母本扩增位点检出的谱带 81 条, 占谱带总数 28.62%, 另出现 8 条为 F₁-1 自身的特异带, 占谱带总数 2.83%。

F₁-2 共扩增出 292 条谱带, 其中在双亲扩增位点中均可检出的谱带 164 条, 占谱带总数 56.16%, 单独在父本扩增位点检出的谱带 39 条, 占谱带总数 13.36%, 单独在母本扩增位点检出的谱带 79 条, 占谱带总数 27.05%, 另出现的 10 条为 F₁-2 自身的特异带, 占谱带总数 3.42%。

F₁-3 共扩增出 299 条谱带, 其中在双亲扩增位点中均可检出的谱带 166 条, 占谱带总数 55.52%, 单独在父本扩增位点检出的谱带 40 条, 占谱带总数 13.38%, 单独在母本扩增位点检出的谱带 82 条, 占谱带总数 27.42%, 另出现 11 条为 F₁-3 自身的特异带, 占谱带总数 3.68%。

3 个单株各种谱带比例比较稳定, 其中与父母本共有的谱带比例最高, 全都超过 55%, 说明 3 个单株明显地继承了双亲的共有谱带, 而 3 个单株单独与母本共有谱带是单独与父本共有谱带的 2 倍多, 表明 F₁ 代继承母本的能力强。3 个单株特异带比例比较一致, 可能表明 3 个单株遗传变异差异不大。在 3 个单株之间, 谱带也存在一些差异, 除了谱带总数不同之外, 3 个子代共有谱带只有 218 条, 分别占各自总谱带的 77.03%、74.66% 和 72.91%, 3 个单株之间的差异说明在杂交后代中筛选优异材料的可行性。

通过 ISSR 鉴定, 可以明显看出杂种与亲本之间差异 (图 1)。因为 ISSR 标记是显性标记 (Ziekiewicz et al., 1994), 对杂种鉴定可根据 F₁ 代有无父母本的特征带来鉴定其杂交是否成功。在 3 个 F₁

子代中, 来自父母的谱带 F₁-1 有 97.17%, F₁-2 有 96.58%, F₁-3 有 96.32%, 卡平方检验表明 F₁代扩增出的谱带数与亲本各对应位点所显示的谱带数间没有显著差异, 说明这 3 个 F₁子代在遗传基础上的确是来源于云南大理茶和福鼎大白茶。本试验中 F₁代 3 个单株中均出现了亲本没有的特异谱带, 可能是亲本杂交时染色体交换所引起的。

表 2 杂交 F₁ 代 ISSR-PCR 扩增带数与来源
Table 2 Amount of bands of F₁ and their origin by ISSR-PCR

引物 Primer	碱基序列 5'→3' Base sequence 5'→3'	F ₁ -1 (♂, ♀, ♀ + ♂)	F ₁ -2 (♂, ♀, ♀ + ♂)	F ₁ -3 (♀, ♂, ♀ + ♂)
S807	AGAGAGAGAGAGAGCT	25(5, 8, 10)	25(3, 8, 13)	23(3, 8, 11)
S808	AGAGAGAGAGAGAGCC	11(2, 4, 5)	12(1, 5, 6)	13(2, 5, 6)
S810	GAGAGAGAGAGAGAT	20(1, 5, 14)	13(1, 2, 10)	19(1, 6, 12)
S811	GAGAGAGAGAGAGAC	18(2, 3, 13)	17(3, 4, 10)	19(4, 5, 10)
S834	AGAGAGAGAGAGAGCT	12(1, 2, 9)	13(1, 2, 10)	14(1, 2, 10)
S835	AGAGAGAGAGAGAGGC	29(4, 9, 15)	25(4, 7, 13)	27(3, 8, 14)
S836	AGAGAGAGAGAGAGCA	14(1, 2, 11)	14(1, 2, 10)	13(1, 2, 10)
S840	GAGAGAGAGAGAGACT	23(4, 7, 11)	27(5, 8, 12)	22(3, 6, 12)
S841	GAGAGAGAGAGAGAGC	22(1, 7, 13)	25(4, 5, 14)	23(4, 5, 13)
S848	CACACACACACACATG	27(3, 8, 15)	32(2, 10, 20)	30(2, 11, 16)
S856	ACACACACACACACGA	21(3, 3, 15)	21(3, 4, 14)	22(3, 4, 15)
S890	CACGTGTGTGTGTGT	13(3, 3, 7)	12(2, 3, 7)	16(4, 4, 8)
ISSR2	AGAGAGAGAGAGAGCT	18(2, 8, 7)	26(6, 8, 10)	27(5, 7, 12)
ISSR4	TCTCTCTCTCTCTCACT	21(2, 9, 9)	19(1, 9, 9)	21(2, 7, 11)
ISSR8	ACACACACACACACT	9(1, 3, 5)	11(2, 2, 6)	10(2, 2, 6)
合计 Total		283(35, 81, 159)	292(39, 79, 164)	299(40, 82, 166)

注: 括号外谱带数与括号内谱带数之差为 F₁ 特异带数。
Note: The margins between bands in parentheses and bands out parentheses are specific bands of filial generations.

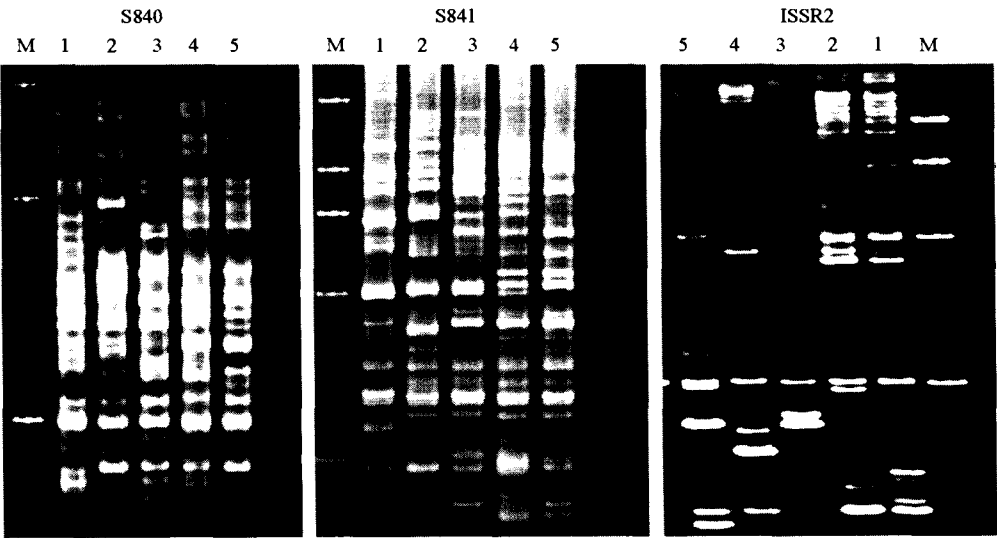


图 1 引物 S840、S841 和 ISSR2 的扩增图谱

1. 福鼎大白茶; 2. 云南大理茶; 3. F₁-1; 4. F₁-2; 5. F₁-3。

Fig. 1 Amplification electrophoresis parameters of primer S840, S841 and ISSR2

1. Camellia sinensis 'Fuding Dabaicha'; 2. C. taliensis (W. W. Smish) Melchior; 3. F₁-1; 4. F₁-2; 5. F₁-3.

茶树本身为高度杂合体, 在减数分裂时, 各非同源染色体之间可能自由组合在一个子细胞里, 而且染色体的非姊妹染色单体之间的片段还可能出现各种形式的交换。极少数在亲本中出现的谱带(母本 5 条, 父本 7 条)在子代中没有表现, 也可能是这个原因, 从理论上说, 当子代样本足够多时, 亲本所有的谱带在子代中都能表现。

利用 15 个引物在 5 个材料中扩增出的 390 条谱带, 计算材料之间的相似系数(GS 值), 结果表明, 5 个材料 GS 值在 0.69~0.89 之间, 其中, 福鼎大白茶与云南大理茶的 GS 值最低, 为 0.69, 表明它们的遗传相似程度低, 遗传学差异大。 F_1-2 和 F_1-3 的 GS 值最大, 为 0.89, 表明它们的遗传相似程度高, 遗传学差异小。而 F_1-1 与 F_1-2 或 F_1-3 的 GS 值比 F_1-2 和 F_1-3 的 GS 值要低得多, 表明 F_1-1 与 F_1-2 或 F_1-3 之间的遗传学差异比 F_1-2 和 F_1-3 之间的差异大。同时, 三者的差异说明尽管杂种来自共同双亲, 但在后代个体之间出现了 DNA 水平上的遗传分化。这种个体之间的差异为筛选新的育种材料提供了条件。

根据 ISSR 标记数据计算材料间的遗传相似系数矩阵, 采用 UPGMA 法构建了 5 份茶树材料的遗传关系聚类图(图 2)。通过聚类可以清晰地看到, 当以 GS 值 0.78 来划分时, 福鼎大白茶、云南大理茶与杂种在树状图上聚为 3 支, 云南大理茶单独聚为一类, 说明它与其它材料的亲缘关系较远。而杂种材料作为福鼎大白茶与云南大理茶的杂交后代, 单独作为一个分支聚在一起, 显示了它们较近的亲缘关系。

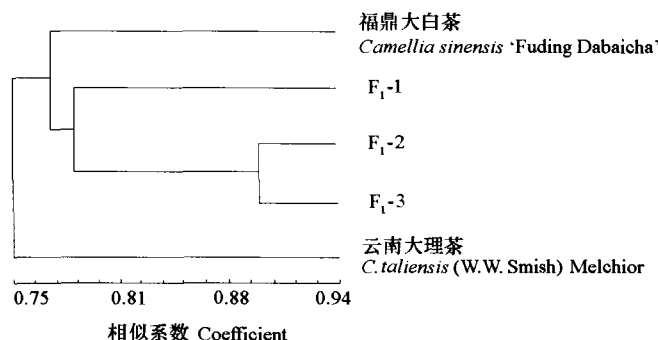


图 2 基于 ISSR 标记的 5 个供试材料的聚类图

Fig. 2 Dendrograms illustrating the phylogenetic relationship among 5 materials based on ISSR markers

3 讨论

茶组植物种间杂交存在的障碍主要表现为: 杂交不亲和, 不能实现受精; 杂种易夭亡不能结实, 即使结实, 结实率低, 甚至完全不育; 幼胚停止发育; 幼胚中途死亡; 杂种不萌发; 幼苗中途夭亡等。本试验中种子播种培养的杂种, 萌芽率为零。而利用幼胚组培和杂种胚培苗丛芽再生技术(周健等, 2005)对杂交幼胚进行组培, 结果成功获得了杂种胚培苗, 扩大了每个杂种的群体, 防止因杂种胚培苗的中途死亡而导致杂种的损失, 目前已经获得了 47 株胚培苗。研究表明幼胚组培是解决茶组植物种间杂交育种困难的有效途径。

利用分子标记进行茶树杂种鉴定的研究很少。梁月荣等(2000)、黎星辉等(2001)利用 RAPD 技术对自然和人工杂交材料进行了亲本鉴定, 从而肯定了分子标记技术在茶树亲子鉴定中的有效性。本试验通过 ISSR 分子标记分析表明, 云南大理茶与福鼎大白茶种间的相似性系数为 0.688, 两者杂交后代与杂交亲本间的相似性系数介于 0.744~0.792 之间, 结合聚类分析表明它们杂交后代遗传性介于两者间, 受福鼎大白茶的遗传影响稍强, 这可能是因为福鼎大白茶有很强的适应力, 在较稳定的

生态条件下其遗传性较强。

杂种优势的产生在于两亲本之间的遗传差异,两亲本在亲缘关系、类型、地理起源以及各种遗传性状上差异大的杂交组合才能表现出明显的杂种优势。云南大理茶是优异的红茶种质资源,而福鼎大白茶抗性好,两者地理起源差异大,杂交后代有可能表现出明显的杂种优势,从 ISSR 指纹图谱及聚类分析结果来看,两者遗传距离较大,分属不同的种,这从分子水平解释了其后代可能具有较强杂种优势的原因。此外,在茶树育种过程中,可以通过分子标记技术对所引进材料进行亲缘关系鉴定及杂交后代的早期鉴定,为杂交育种提供分子依据。

References

- Bai Kun-yuan. 2001. China tea varieties. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press: 15 - 16. (in Chinese)
- 白堃元. 2001. 中国茶树品种志. 上海: 上海科学技术出版社: 15 - 16.
- Indra S, Amita B, Paramvir S A. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65 (1): 75 - 80.
- Li Xing-hui, Shi Zhao-peng, Liu Chun-lin, Luo Jun-wu, Shen Cheng-wen, Gong Zhi-hua. 2001. Parentage identification of filial generation tea plants from "Yunnan Daye" and "Rucheng Baimao" with RAPD method. *Journal of Tea Science*, 21 (2): 99 - 102. (in Chinese)
- 黎星辉, 施兆鹏, 刘春林, 罗军武, 沈程文, 龚志华. 2001. 云南大叶茶与汝城白毛茶杂交后代的 RAPD 亲子鉴定. *茶叶科学*, 21 (2): 99 - 102.
- Liang Yue-rong, Tanaka J, Takeda Y. 2000. Parentage analysis of tea clone "Okumidori" with RAPD method. *Journal of Tea Science*, 20 (1): 22 - 26. (in Chinese)
- 梁月荣, 田中淳一, 武田善行. 2000. 应用 RAPD 分子标记分析“晚绿”品种的杂交亲本. *茶叶科学*, 20 (1): 22 - 26.
- Liu Ben-ying, Wang Ping-sheng, Zhou Hong-jie, Ji Peng-zhang, Xu Mei, Cheng Zai-quan. 2006. The ISSR-PCR reaction system's establishment about Yunnan section *Thea* plant. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 21 (Supplement): 21 - 25. (in Chinese)
- 刘本英, 王平盛, 周红杰, 季鹏章, 许玫, 程在全. 2006. 云南茶组植物 ISSR-PCR 反应体系的建立. *云南农业大学学报*, 21 (增刊): 21 - 25.
- Mondal T K. 2003. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis*) // Jain S M, Ishii K. Micropropagation of woody trees and fruits. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 671 - 720.
- Wang Ping-sheng, Yu Fu-lian. 2002. The geographic distribution, diversity and utilization of wild tea camellias in China. *Journal of Tea Science*, 22 (1): 105 - 108. (in Chinese)
- 王平盛, 虞富莲. 2002. 中国野生大茶树的地理分布、多样性及其利用价值. *茶叶科学*, 22 (1): 105 - 108.
- Ye Nai-xing, Yang Ru-xing, Guo Ji-chun, Yang Jiang-fan. 2004. Genetic resources diversity and cultivars enhancement of tea in Fujian. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry university: Natural Science Edition*, 33 (2): 174 - 177. (in Chinese)
- 叶乃兴, 杨如兴, 郭吉春, 杨江帆. 2004. 福建茶树遗传资源的多样性和品种创新. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 33 (2): 174 - 177.
- Zhou Jian, Cheng Hao, Wang Li-yuan. 2005. The optimization research on tissue culture and rapid propagation of *Camellia sinensis*. *Journal of Tea Science*, 25 (3): 172 - 176. (in Chinese)
- 周健, 成浩, 王丽鸳. 2005. 茶树组培快繁技术的优化研究. *茶叶科学*, 25 (3): 172 - 176.
- Ziekiewca E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2): 176 - 183.