

应用 AFLP 技术鉴别不同地区的普洱茶晒青毛茶

季鹏章^{1,2}, 吕才有³, 梁名志¹, 张俊¹, 黄兴奇²

(1. 云南省农业科学院茶叶研究所, 云南 昆明 650203; 2. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650203; 3. 云南农业大学普洱茶学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 为鉴别不同地区的普洱茶晒青毛茶, 对 31 个来自不同地区的普洱茶晒青毛茶进行 AFLP-毛细管电泳技术分析, 一共得到 426 个可重复的位点, 多态位点百分率为 94.6%, 聚类分析主要分为台地茶类、老树茶类等两大类。结果表明, 采用以下方法可鉴别不同来源的普洱茶晒青毛茶: 从典型的主要特征峰和染色信号的最高值和次高值来区别; 从峰形图的整个形状来区分; 与对照的峰形图比较来区分。表明 AFLP-毛细管电泳技术是一种高效的分子标记技术, 能成功应用于不同区域普洱茶晒青毛茶的鉴别。

关键词: 普洱茶; 晒青毛茶; AFLP

AFLP Fingerprinting for Identifying Geographical Origins of 31 Sun-dried Tea (Maocha) Samples

Ji Peng-zhang^{1,2}, Lü Cai-you³, Liang Ming-zhi¹, Zhang Jun¹, Huang Xing-qi²

(1. Institute of Tea Research, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650203, China;
2. Institute of Biotechnology and Genetic Germplasm, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650203, China;
3. College of Pu'er Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) markers were employed to identify the geographical origins of 31 sundried tea samples, which was a material for Pu'erh tea processing. A total of 420 polymorphic bands out of 426 reproducible products were amplified. Percentage of polymorphic loci (P) was 94.6%. Dendrogram generated after UPGMA clustering by NTSYS software indicated that 31 samples could be divided into conventional and ancient tea type. There were three methods to identify ancient tea and conventional tea, and to discriminate ancient tea from other geographical origins using AFLP marker: (1) based on the main peak value and the highest and second highest value of dye signal of tea samples. (2) based on the whole AFLP diagram of different samples. (3) compare target tea AFLP diagram with control tea group AFLP diagram. The result showed that AFLP marker was an effective tool and a robust method in discrimination of sun-dried tea (Maocha).

Key words: Pu'erh tea; sun-dried tea; amplified fragment length polymorphism (AFLP)

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)24-0264-04

普洱茶是以云南大叶种茶树的鲜叶经杀青、揉捻、日晒等工序制成的晒青毛茶为原料, 再经发酵、蒸揉、成型制成各种形状的成品普洱茶^[1]。晒青毛茶是普洱茶特异品质的物质基础。普洱茶有“青饼”和“熟普”之分, 以晒青毛茶为原料, 压制成“青饼”, 目前市场流通中交易常称为“生普”(生茶), 是普洱茶的历史原形; “熟普”(熟茶)是“生普”在后期经渥堆后发酵所形成的品质独特的一类茶叶^[2]。普洱茶因其独特品质和保健功效, 产业发展十分迅速。用著名古茶园所产鲜叶制作的老树茶晒青, 品质优于用台地茶园所产

鲜叶制作的台地茶晒青, 价格居高不下; 但古茶园晒青产量有限, 导致了假冒著名老树茶的大量出现。与此同时, 市场上出现了部分用中小叶种、大理茶等非云南大叶种鲜叶制作的假冒“普洱茶”晒青, 严重影响了普洱茶的声誉。老树茶是指由百年以上的古茶园所产鲜叶加工而成的普洱茶, 云南省现有古茶园 4 万 hm²; 台地茶是指采制于新中国成立后发展建立的密植条栽茶园, 云南省现有该类茶园近 20 万 hm²。

晒青毛茶的鉴定目前主要依据感官审评、内含化学成分分析等方法, 然而, 上述方法存在分析费用高、

收稿日期: 2010-08-19

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD58B06); 云南省应用基础研究计划重点项目(2006C0012Z)

作者简介: 季鹏章(1975—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为茶树种质资源与遗传改良。E-mail: pengzhji@126.com

标准不一致等问题。多种分子标记技术已成功应用于茶叶、茶树的鉴别,如 RAPD^[3-4]、RFLP^[5]、5S rRNA^[6]、AFLP^[7]。本实验在收集云南不同区域的 31 份普洱茶晒青毛茶的基础上,采用 AFLP 毛细管电泳技术对其进行分析,旨在区分不同区域的老树茶、区分老树茶与台地茶,为普洱茶原产地保护提供参考,促进普洱茶的持续健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:共收集晒青毛茶样本 31 个,包括普洱茶的主要原产地——云南省西双版纳州、普洱市、临沧市等地的晒青毛茶。临沧二嘎子茶经鉴定为大理茶种(*Camellia taliensis* 大理茶)、佛香茶为中小叶种(*C. sinensis* var. *sinensis* 茶),其余样本都是云南大叶种(*C. sinensis* var. *assamica* 阿萨姆茶)所制晒青毛茶(表 1)。

表 1 普洱茶晒青毛茶来源

Table 1 Sun-dried tea samples in this study

代号	样品	来源	类型	代号	样品	来源	类型
M1	1 号样	勐海	未知	M17	老班章	勐海	老树
M2	2 号样	勐海	未知	M18	巴达	勐海	老树
M3	3 号样	勐海	未知	M19	勐混	勐海	老树
M4	4 号样	勐海	未知	P1	孟连	普洱孟连	台地
M5	5 号样	勐海	未知	P2	普洱 1	普洱宁洱	台地
M6	6 号样	勐海	未知	P3	普洱 2	普洱宁洱	台地
M7	7 号样	勐海	未知	P4	普洱饼茶	普洱宁洱	台地
M8	9 号样	勐海	未知	P5	澜沧大山	普洱澜沧	台地
M9	勐宋大安	勐海勐宋	台地	L1	临沧 1	临沧	台地
M10	佛香茶	勐海	台地	L2	临沧 2	临沧	台地
M11	紫娟	勐海	台地	L3	蚂蚁堆	临沧	台地
M12	紫芽茶	勐海	台地	L4	勐库茶	临沧	老树
M13	布朗山	勐海	台地	L5	白莺山	临沧	老树
M14	曼迈	勐海	老树	L6	二嘎子茶	临沧	老树
M15	老茶树	勐海	老树	L7	黑条子茶	临沧	老树
M16	格朗和	勐海	老树				

Taq 酶、MgCl₂、10 × PCR buffer Fermentas MBI 公司;EcoRI 酶、MseI 酶、T4 连接酶试剂盒 日本 Toyobo 公司;琼脂糖 西班牙 Pharmacia 公司。

CEQ8000 遗传分析系统 美国贝克曼库尔特公司;5415R 离心机 德国 Eppendorf 公司;PTC-200 型 PCR 仪 美国 MJ 公司。

1.2 DNA 的提取和 AFLP-PCR 的扩增

采用改进的 CTAB 法^[8],用于正式扩增的样品都用 RNA 酶 A 进行纯化。纯化后的 DNA 用紫外分光光度计测定 260nm 和 280nm 波长处的光密度值。用于 PCR 反应的总 DNA 浓度稀释到 200ng/μL。扩增反应参照文献[9]。

1.3 AFLP-毛细管电泳

整个流程在遗传分析系统上完成,采用荧光标记技术和毛细管电泳分离技术,扩增产物在高分辨率毛细管中电泳分离,激光激发荧光采集数据,电泳结果通过软件自动统计分析并转化为“0、1”矩阵备用,同时导出电泳分离图谱。

1.4 数据处理和分析

输入得到的 0、1 矩阵,用 NTSYSpc 2.0^[10]对除 M1~M8 之外的 M9~M19、P1~P5、L1~L7 等 23 个样本进行 UPGMA 聚类分析。同时分析 31 个样本的电泳分离图谱。

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物组合的扩增结果

两对选中的 AFLP 引物共扩增出可重复的 426 条带,检测出 403 个多态性($P=94.6\%$),平均每对引物扩增的总带数为 213 条,多态性条带 201.5。引物 E-AAC/M-CTG 的 $P=94.62\%$,引物 E-AAC/M-CTA 的 $P=94.58\%$ (表 2)。

表 2 所用引物组合及其检测效率

Table 2 Primers used in AFLP and their screening efficiency

引物组合	引物系列	扩增位点	多态性位点	多态性比率/%
E-AAC-MCTG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGT-3'	223	219	94.62
E-AAC-MCTA	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGT-3'	203	201	94.58
总计		426	403	94.6
平均		213	201.5	

2.2 聚类分析

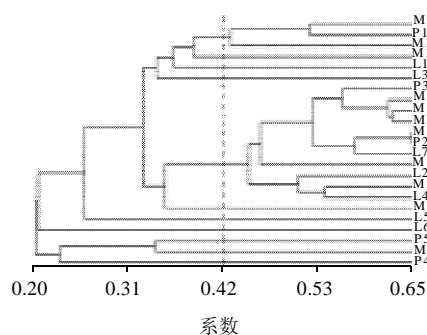


图 1 23 个晒青毛茶的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA dendrogram based on Jaccard similarities of 23 tea samples

根据 Jaccard 相似性系数^[11],对 M9~M19、P1~P5、L1~L7 等 23 个样品进行 UPGMA 聚类(图 1),相似性系数在 0.33 左右时,可分为 2 个大的类群,5 个小类群。第一个大类群由勐宋大安(M9)、紫芽(M12)、布

朗山(M13)、孟连(P1)、临沧 1(L1)、蚂蚁堆(L3)等 6 个样品构成;第二个大类群由紫娟(M11)、曼迈(M14)、老茶树(M15)、格朗和(M16)、老班章(M17)、巴达(M18)、勐混(M19)、普洱 1(P2)、普洱 2(P3)、临沧 2(L2)、勐库(L4)、黑条子茶(L7)等 12 个样品构成;5 个小类群分别是佛香(M10)、普洱饼(P4)、澜沧大山(P5)、白莺山(L5)和二嘎子茶(L6)。

2.3 AFLP-毛细管电泳图谱分析

表 3 31 个晒青毛茶引物 E-AAC/M-CTG 的毛细管电泳图谱主要峰值

Table 3 Main peak values of 31 tea samples in AFLP fingerprint patterns using primer combination E-AAC/M-CTG

代号	茶样	主要峰值(碱基对)/bp									
M1	1 号样	102	124	145	153	171*	228	334#	361	415	
M2	2 号样	96	127	145*	171#	228	259	306	360		
M3	3 号样	93	124	145*	153#	171	228	334	362	415	
M4	4 号样	99	124	145*	153	171#	229	340	415		
M5	5 号样	127	145#	153	171*	334	415				
M6	6 号样	96#	124	145*	153	171	360	415			
M7	7 号样	96	127	145*	153	171#	229	259	306	383	
M8	9 号样	96	145#	171*	228	259	333	362			
M9	勐宋大安	143*	153	171#	129						
M10	佛香茶	153#	234*								
M11	紫娟	83#	96	127	145	171*	228	243	321	362	415
M12	紫芽茶	99*	145*	229	207	363					
M13	布朗山	145*	151	171	228#	259	361	440			
M14	曼迈	61	96	102	124	145#	153	171*	263	334	362
M15	老茶树	96	145#	153	171*	228	263	333	415		
M16	格朗和	96	127	145*	171#	228	260	362	415	472	
M17	老班章	96	127	145*	171	228#	259	306	360		
M18	巴达	93	127	145#	153*	171	228	333	415		
M19	勐混	126	145*	153#	171	209	228	259	305	360	415
P1	孟连	96	124	145#	171*	228	234	260	361		
P2	普洱 1	102	124	145*	153	171*	229	259	362		
P3	普洱 2	96	145*	153	171#	228	264	305	362		
P4	普洱饼茶	61*	100	153#	333	415	522				
P5	澜沧大山	210*									
L1	临沧 1	83	127	145*	171#	228	252	259#	305	361	415
L2	临沧 2	127	145#	154*	172	264	334	416			
L3	蚂蚁堆	94	145	153*	171#	333	415				
L4	勐库茶	114*	154#	172	334						
L5	白莺山	107	124	153	172*	213#	246	272	321	333	429
L6	二嘎子	96*	173								
L7	黑条子茶	113*	124	145	171#	228	260	331	360	415	

注: *.染色信号最高值;#.染色信号次高值。下同。

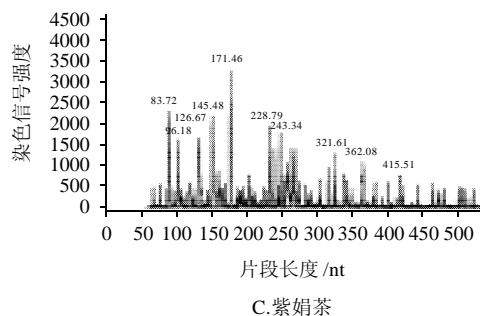
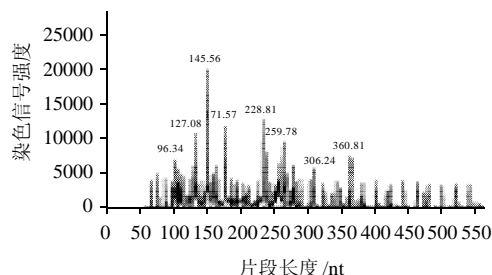
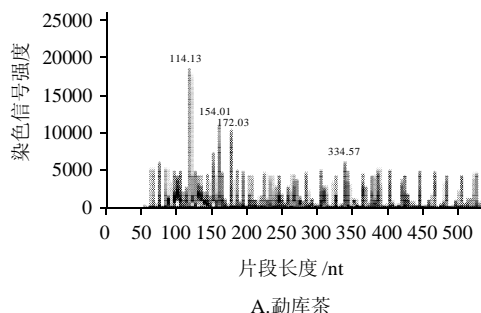


图 2 引物 E-AAC/M-CTG 对不同茶样的 AFLP 选择性扩增电泳图谱

Fig.2 AFLP fingerprint patterns of tea samples using primer combination of E-AAC/M-CTG

表 4 31 个晒青毛茶引物 E-ACC/M-CTA 的毛细管电泳图谱主要峰值

Table 4 Main peak values of 31 tea samples in AFLP fingerprint patterns using primer combination E-ACC/M-CTA

代号	茶样	主要峰值(碱基对)/bp									
M1	1 号样	84	112	132	164	177	277	283	333#	338*	443
M2	2 号样	124	132	176#	207	220	247	282	323	337*	414
M3	3 号样	163	177#	283	324	338*					
M4	4 号样	84	124	132#	176#	282	337*	414			
M5	5 号样	96	132#	164	177	221	248	283	338*	443	
M6	6 号样	97	132#	163	207	282	337*	442			
M7	7 号样	84	132	164	177	197	248	333#	338*	415	443
M8	9 号样	124	132*	176#	247	282	332	337	353	414	443
M9	勐宋大安	97	132#	164	177	221	248	283	338*	415	443
M10	佛香茶	132	169	247	282	332#	337*				
M11	紫娟	98	132	160#	164*	207	276	282	301	337	428
M12	紫芽茶	84	132#	169	283	332	456				
M13	布朗山	132	176#	221	248	283	324	338*	413	443	
M14	曼迈	84	132#	176*	282#	323	353	414	443		
M15	老茶树	84	132#	169#	247	282	323	337*	414	443	476
M16	格朗和	132	169	176#	282	323	337*	443			
M17	老班章	102	124	132#	169	282	337*	442	523		
M18	巴达	84	132	169#	282	337*	443				
M19	勐混	84	102	124	132*	169#	247	282	337*	442	
P1	孟连	97	125	132*	164	248	283	324	333	338#	444
P2	普洱 1	96	132#	176*	282	337	353	414	443	510	
P3	普洱 2	117	124	132#	160*	169	207	247	282	332	414
P4	普洱饼茶	176#	282	337*							
P5	澜沧大山	337*									
L1	临沧 1	84	124	132	169#	207	248	324	337*	443	476
L2	临沧 2	132#	160	176	282	337*					
L3	蚂蚁堆	169	176#	338*							
L4	勐库茶	132#	169	207	247	282	332	337*	442		
L5	白莺山	332*									
L6	二嘎子	84	112	176	215	282#	332*	456			
L7	黑条子茶	84	132	163	176#	282	323	337*	442		

两对 31 个 AFLP-毛细管电泳图谱都有一定的差异,见图 2 和表 3、4。引物 E-AAC/M-CTG 则有明显的差异,如二嘎子茶 96、215 特征峰,佛香茶的 234 特征峰,紫娟的 83、198、200 特征峰,勐库茶的 199、511 特征峰,澜沧大山的 210 特征峰;引物 E-AAC/M-CTA 的如白莺山 332 特征峰等。此外,对于图形比较类似的样品,可以依据染色信号的最高值和次高值来进行比较,如勐海格朗和、老班章、巴达,引物 E-AAC/M-CTA 最高值都是 337,但次高值分别为 176、132、169。因而可成功地将三者区分出来。

3 讨论

3.1 23 个晒青毛茶的聚类分析

从聚类图可以看出第一个大类群由勐宋、布朗山等 6 个样品构成,6 个样品都为台地茶,分析第一大类群由台地茶构成。第二个大类群由老班章、勐混、巴达、曼迈、格朗和等 12 个样品构成。这 12 个样品中老班章、勐混、巴达、曼迈、格朗和、老茶树、勐库和黑条子茶等多数样本为老树茶,分析第二大类群主要由老树茶构成。此外,5 个小类群中,佛香茶(*C. sinensis* var. *sinensis*)、临沧二嘎子茶(*C. taliensis*)与云南大叶种亲缘关系较远。而临沧白莺山则推测白莺山是茶树种质资源库,生长有大理茶等其他茶组植物,白莺山茶可能混杂有其他茶组植物的基因^[12-13],因而与大叶种亲缘关系较远。

3.2 晒青毛茶 AFLP-毛细管电泳鉴别技术分析

陈亮等^[3]应用 RAPD 标记对原产于云南等地的 24 份野生茶树资源进行分子鉴定研究。结果表明, RAPD 标记在鉴定茶树种质资源方面非常有效。有 3 种独立的方法可以用于茶树种质资源的分子鉴定:特殊的标记;特异的谱带类型;不同引物提供谱带类型的组合。16 个特异标记的存在和 3 个特异标记的缺失可以鉴定 14 份资源;Singh 等^[4]用从市场上购来的 10 个不同品牌的红茶、绿茶,提取 DNA,用 RAPD 鉴别,并认为该方法用来证明某著名品牌的茶叶的来源,有极大的应用性。Matsumoto 等^[5]用 RFLP 技术,以 PAL 基因为探针鉴别日本绿茶的遗传差异,集合 2 种限制性内切酶,2.3kb 的探针能从阿萨姆种茶中鉴别出日本绿茶。Dhiman 等^[6]报道从 5S rRNA 基因片段设计了种间的特异 PCR 探针,并成功地检测到在茶叶样品中掺杂的腰果壳。从上述报道可看出,分子标记在茶树种质和产品鉴别是可行的。

本研究所用的 AFLP-毛细管电泳技术,一对引物可扩增出 200 多个位点,位点差异在 1bp 都能检测到,更容易检测出材料的细微差异,同时采用高效自动化技术,降低了人为操作带来的误差,易于对扩增样本进行标准化分析,提高了数据的可靠性。通过对 31 个晒青毛茶的分析,31 个晒青毛茶的分析 AFLP 毛细管电

泳图谱都有差异,可以通过以下方法来区分不同地区的晒青毛茶、区分老树茶与台地茶:①从典型的主要特征峰和染色信号的最高值和次高值来区别,如勐库茶的 199、511 特征峰和澜沧大山的 210 特征峰;②从峰形图的整个形状来区分;③与对照的峰形图比较来区分。此外,该技术还可以用于鉴别非云南大叶种加工的晒青毛茶,如本实验中的佛香茶、二嘎子茶,二者与云南大叶种晒青的 AFLP 图谱有明显的区别。说明 AFLP-毛细管电泳技术可用于普洱茶的真伪鉴别。

不同区域晒青毛茶的鉴别技术是非常复杂的,梁名志等^[14]以云南省的古茶园和台地茶园的蒸青茶、晒青茶为样品,从感官审评、内含品质化学成分和矿物质元素检测分析得出:老树茶与台地茶确有差异,但很难用感官审评、内含品质化学成分和矿物质元素检测等方法来区分。云南普洱茶产地广泛,本次研究用 AFLP-毛细管电泳虽取得一定进展,但并没有覆盖所有普洱茶典型产地。今后要对普洱茶典型产地继续开展 AFLP-毛细管电泳分析,通过数据、图谱的积累,形成一整套完整的不同古茶山的 AFLP-毛细管电泳数据库,应用于不同产地普洱茶晒青毛茶的鉴别。将更能发挥出 AFLP-毛细管电泳技术的优势,为云南普洱茶产业的健康发展服务。

参考文献:

- [1] 田洋,肖蓉,徐昆龙,等.普洱茶加工过程中主要成分及相关性研究[J].食品科学,2010,31(11):20-24.
- [2] 宁蓬勃,郭抗抗,王晶钰,等.云南普洱茶砷和汞的含量分析[J].食品科学,2010,31(8):150-153.
- [3] 陈亮,王平盛,山口聪.应用 RAPD 分子标记鉴定野生茶树种质资源研究[J].中国农业科学,2002,35(10):1186-1191.
- [4] SINGH M, BANDANA, AHUJA P S. Isolation and PCR amplification of genomic DNA from market samples of dry tea[J]. Plant Mol Biol Rep, 1999, 17: 171-178.
- [5] MATSUMOTO S, KIRIWA Y, TAKEDA Y. Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 998-1002.
- [6] DHIMAN B, SINGH M. Molecular detection of cashew husk (*Anacardium occidentale*) adulteration in market samples of dry tea (*Camellia sinensis*) [J]. Letter Planta Med, 2003, 69: 882-884.
- [7] 季鹏章,黄兴奇,王平盛,等.古茶园台地茶园遗传多样性的 AFLP 分析研究[J].遗传,2009,31(1):101-108.
- [8] DOYLE J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[C]// HEWITT G M, JOHNSTON A. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer, 1991: 283-293.
- [9] BALASARAVANAN T, PIUS P K, RAJ K R, et al. Genetic diversity among south Indian tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) using AFLP markers[J]. Plant Sci, 2003, 165: 365-372.
- [10] ROHLF F J. NTSYS-pc 2.0 numerical taxonomy and multivariate analysis system[CP]. New York: Exeter Software.
- [11] JACCARD P. Nouvelles recherches sur la distribution florale[J]. Bull Soc Vaud Sci Nat, 1908, 44: 223-270.
- [12] 唐一春,王平盛,许玫,等.云南云县白莺山古茶资源考察[J].中国茶叶,2007(5):12.
- [13] 陈文雄,季鹏章,黄兴奇,等.本山茶与勐库茶疑似杂交后代的 RAPD 鉴定[J].北方园艺,2008(10):153-155.
- [14] 梁名志,夏丽飞,张俊,等.老树茶与台地茶品质比较研究[J].云南农业大学学报,2006,21(4):493-497.