

茶樹酯酶同功酶與親緣關係之研究

蔡右任¹

摘 要

以青心烏龍、青心大有、漢口及其雜交 F_1 後代，以及再與青心烏龍為父本之雜交 F_2 後代，阿薩姆共 15 個品種（系）為材料，分析其酯酶同功酶之電泳圖譜，藉以比較各品種（系）間相似度。結果顯示電泳圖譜條帶分布有 16 條，各品種（系）譜條帶分布有 9 至 13 條不等，基本酶譜條帶有 8 條， R_f 分別為 0.12、0.38、0.40、0.47、0.50、0.52、0.59、0.63，出現頻度 86.7 % 以上，而 R_f 0.36、0.44、0.56 出現頻度在 73.3 至 53.3 % 之間，特有條帶 R_f 0.17、0.33、0.42、0.45、0.48 出現頻度則在 40 % 以下。

經聚類分析其相似度在 40–50 % 時，可分為兩大類群，以青心烏龍為父本之 F_2 代選育新品系及台茶 12 號為一類群(I)，而青心烏龍、青心大有、漢口及其雜交 F_1 後代為另一類群(II)，並顯示以青心烏龍為雜交父本之 F_2 代，其與青心烏龍、青心大有、漢口的相似度在 30% 以下。

前 言

台灣茶樹品種約百餘種，其中包括野生茶樹、地方品系、引進品種、育成品種等⁽⁵⁾，農藝性狀上有些品種並不容易區分⁽¹⁶⁾，親緣相關性資料也缺乏，當進行雜交育種時，就育種目標在親本選擇上，只能從親本外觀性狀、生長狀況、適製茶類等相關資料去判別決定。而茶樹屬屢異交作物，遺傳行為複雜，雜交後代變異極大，其與親本相似性如何？本試驗以同功異構酶作為親緣相關指標，就本場現有品種及品系為材料，進行同功異構酶分析。以瞭解親緣相關作為育種時，親本選擇之依據。

長年作物雖能以型態差異如葉型、葉脈分支、茸毛、果實性狀等區分不同品種，但這些都可能受環境及栽培方式影響而改變^(9,16)。因此一種穩定且不易受其他因子影響的遺傳指標工具是極重要的，同功異構酶已成功地被應用於各種作物，作為品種鑑定指標^(1,3,14,15)。其中最多被分析作為指標的同功異構酶有酯酶「芳（香）基酯酶」(EST, Arylesterase EC-3.1.1.2)、穀氨酸草醯乙酸轉胺酶(GOT, Glutamate-oxaloacetate transaminase EC-2.6.1.1)、蘋果酸去氫酶(MDH, Malate dehydrogenase EC-1.1.1.37)、磷酸葡萄糖異構酶(PGI, Phosphoglucose isomerase EC-5.3.1.9)、磷酶葡(萄)糖變位酶(PGM, Phosphoglucomutase EC-2.7.5.1)、過氧化酶(PRX, Peroxidase EC-1.11.1.7)、

1 台灣省茶業改良場文山分場分場長

莽草酸去氫酶(SKDH, Shikimate dehydrogenase EC-1.1.1.25)、超氧歧化酶(SOD, Superoxide dismutase EC-1.15.1.1) (1,2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,17)。

以上同功異構酶經凝膠電泳染色後，呈現不同數目及距離的帶狀分布異構酶圖譜(zymogram)，分析這些圖譜的差異性，可鑑定親緣關係、品種純度、遺傳連鎖性等^(7,8,9,11)。本試驗就應用此方式對茶樹品種間差異進行分析，以連鎖群(Linkage cluster)估算各品種(系)間同功異構酶條帶的相似程度，確立品種(系)間的親緣關係。

材料與方法

一、試驗材料

取樣來自同一生長條件下之文山分場品種園，計 15 個品種或品系，分類成兩類，進行分析比較。

(一) 77 年選育部份發酵茶新品系：

51-14, 51-34, 51-67, 51-69, 51-122 (以青心烏龍為父本之雜交後代)。

(二) 父母本及對照品種部份：

台茶 12 號、青心大有、青心烏龍、紅心烏龍、台茶 6 號、漢口、台農 8 號、台茶 13 號、大有、阿薩姆。

二、分析方法：

(一) 酶抽取方法

採生長至 1 心 5 葉時的新梢，取第 4 葉 50 片分別清洗擦乾，以液態氮冷凍敲碎混合成一個樣品後，貯藏於 -20℃ 下備用。

稱取 0.3g 冷凍葉片樣品，置入陶瓷研鉢中，加入 0.2g PVPP 防止樣品褐化，以液態氮研磨細碎後，加入 1.5ml 抽取緩衝液(0.1M Tris-HCl, pH 7.2, 10% Glycerol, 0.02% 2-Mercaptoethanol)，再加以研磨均質混合。

倒入 2ml 微離心管中，以 10,000rpm，-4℃ 下，離心 20 分鐘，取上層液再離心一次，取澄清液 500 μ l，加入 10 μ l 含 0.1% bromophenol Blue 追蹤染色劑。

(二) 電泳方法：

電泳以 Bio-Rad(Protein II xi)垂直式聚丙烯醯胺膠體系統，膠體長 $\times$ 寬 $\times$ 厚=200 $\times$ 200 $\times$ 1.5mm，依據 Shields *et al.*(1983)修改之方法⁽¹⁴⁾，分離膠濃度為 10%，pH 8.9，濃縮膠濃度為 4.5%，pH 6.7，上下電泳槽之緩衝液為 0.85M Tris-Gly。

每槽樣品量 90 μ l，電泳於 0-4℃ 下，以起始電壓 100V，電泳至分離膠電壓改為 210V，電泳至追蹤染色泳動至膠體底端 1.5 cm 處即停止電泳，取出膠體進行染色。每個品種系樣品皆進行三重複抽取及電泳分析。

(三) 酯酶同功酶染色方法：

酯酶(EST, Arylesterase)染色方法則依據 Vallejos 氏修改後之方法⁽¹⁵⁾。

稱取各 100mg 的 α -Naphthyl acetate 及 β -Naphthyl acetate 溶於 8ml 丙酮中。稱取 Fast Blue RR Salt 200mg 溶於 200ml 磷酸緩衝液(pH 6.2)中。

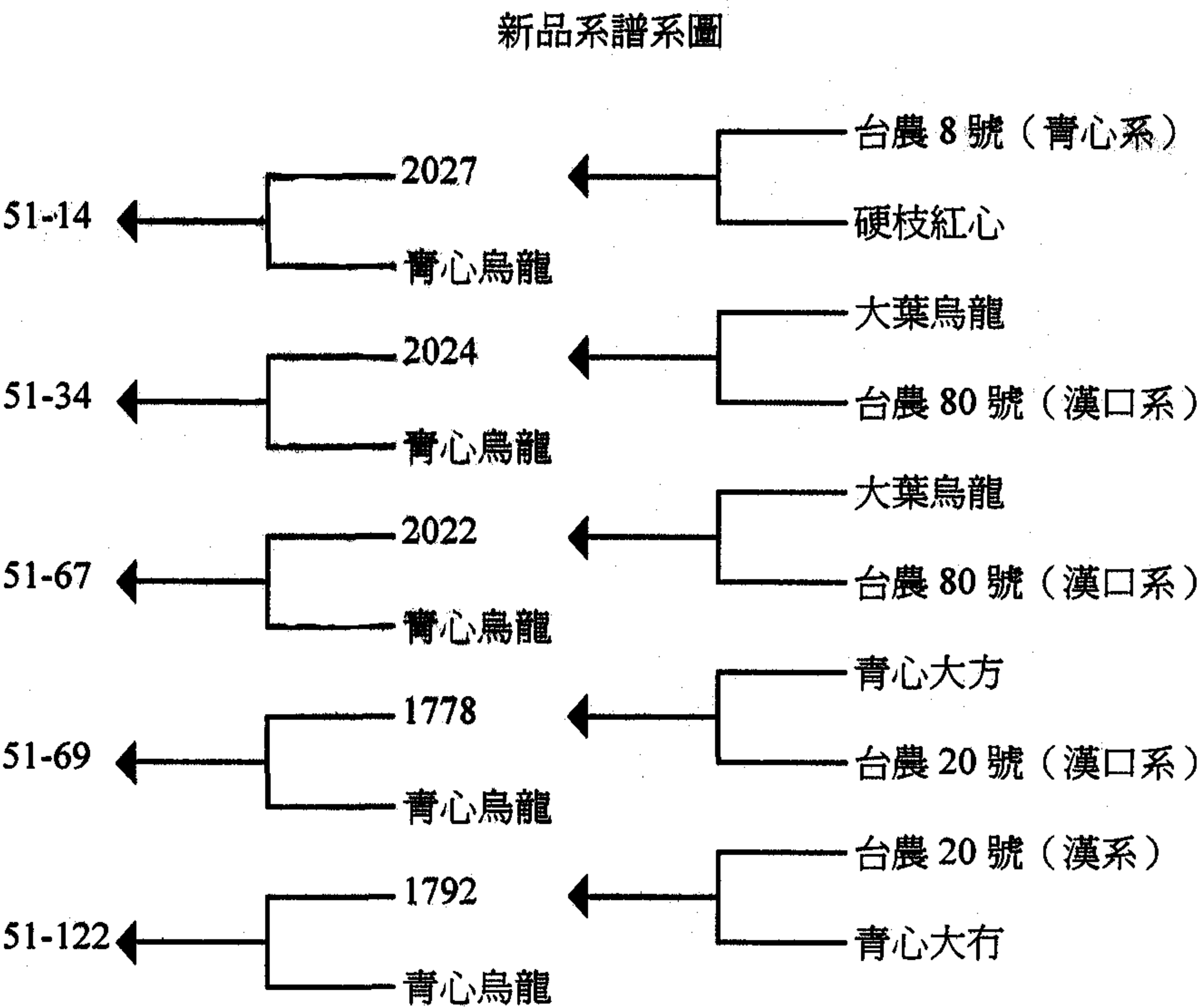
染色前將兩溶液混合，將膠片浸於其中，於室溫黑暗下染色 8 小時。將染色後之膠片，以水：醋酸：酒精(1.5:1.5:1)混合液進行脫色。

(四)酶譜掃描及聚類分析：

脫色後的膠片，以一般光學掃描器以 256 灰階掃描成圖檔，再以 BIO-PROFIL 1D++軟體進行判讀酶譜條帶，並作聚類分析。

結果與討論

在參試的材料上是以 77 年選育部份發酵茶新品系為分析主軸，蓋因其是以青心烏龍為父本的雜交 F₂ 後代，如下新品系譜系所示圖，並以其母本及青心烏龍天然雜交種或近緣種作為材料，比較青心烏龍的遺傳行為。



表一、茶樹新品系及對照品種之葉部性狀

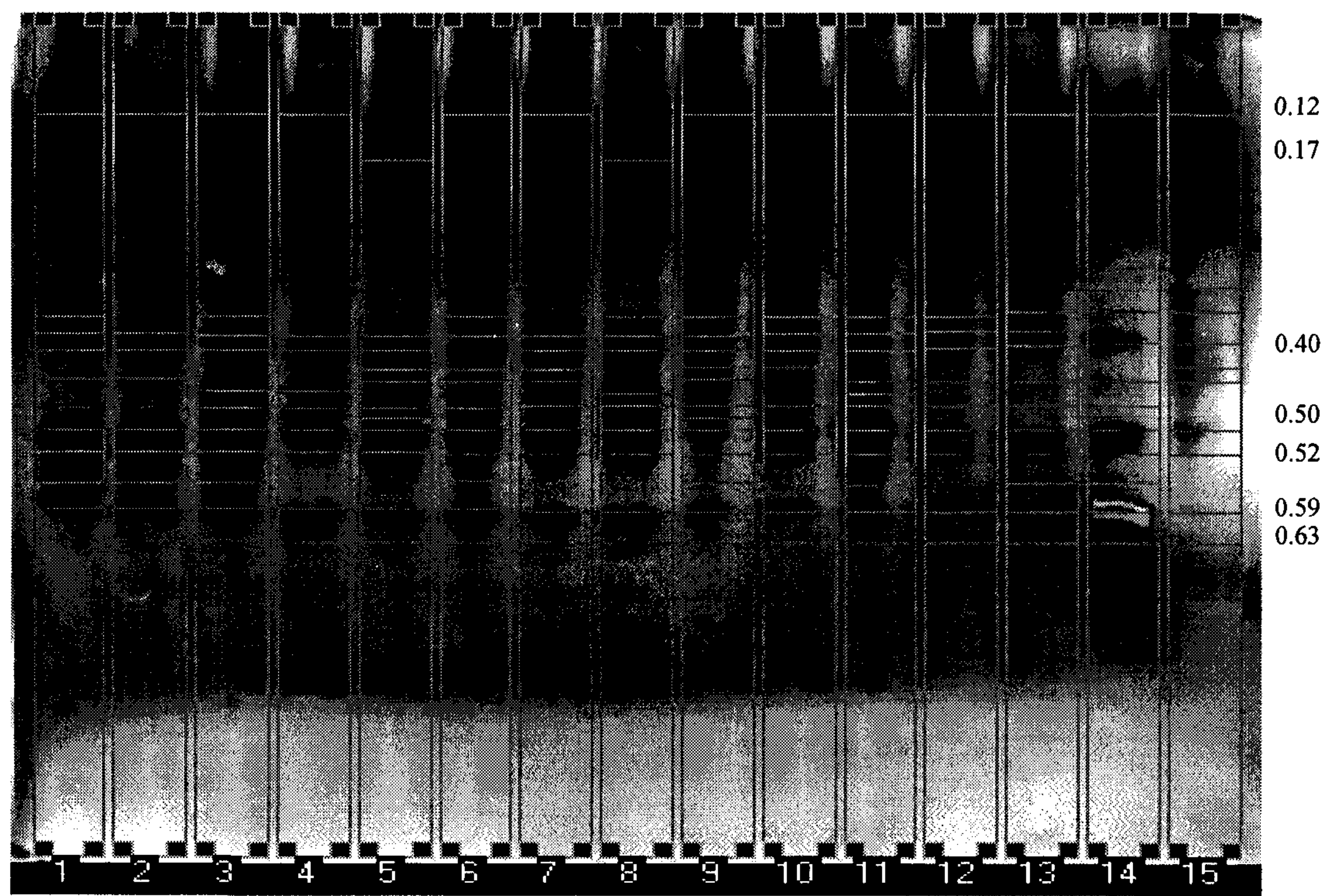
Table 1. The leaf characteristics of new strains and varieties.

種系 性狀	51-14	51-34	51-67	51-69	51-122	台茶 12 號	青心大冇	青心烏龍
百芽重 (g/100 芽)	97.4	112.6	90.4	84.4	79.0	98.8	97.1	69.4
葉面積 (cm ²)	12.7	14.5	14.8	11.0	10.2	14.0	11.0	9.9
葉長寬比	2.41	2.45	2.33	2.67	2.78	2.20	2.48	2.65

*三年之調查平均值

由表一新品系及對照品種之葉部性狀分析，其各項值在品種（系）間的差異，51-69 與 51-122 兩品系間較相似，與其他品種（系）農藝性狀較容易區分，青心烏龍在葉片大小上明顯較小，其餘品種（系）則性狀差異區分不大，且芽色及茸毛多寡亦相似，如借此數值來判別品種（系）則實屬不易，也易發生誤差^(5,17)。

圖1 茶樹酯酶同功酶電泳Rf圖
Fig 1. Zymogram of easterase isozymes found in leaf of tea plants.



1:51-14, 2:51-34, 3:51-67, 4:51-69, 5:51-122, 6:台茶12號, 7:青心大有,8:青心烏龍,
9:台茶6號, 10:紅心烏龍, 11:漢口, 12:台茶13號, 13:大有, 14:台農8號, 15:阿薩姆

由圖一及表二得知茶樹酯酶同功酶各可出現16個不同條帶，各品種系出現條帶有9至13條不等，其中Rf= 0.50、0.52、0.59、0.63 條帶出現頻度為100%，Rf= 0.12、0.38、0.40、0.47條帶出現頻度在93.3-86.7%之間，此為茶樹酯酶同功酶的基本條帶，其中51-122及青心烏龍並不具有Rf= 0.12的條帶，而出現Rf= 0.17的條帶，台茶12號沒有Rf=0.40條帶，與51-34及阿薩姆缺少Rf=0.47的條帶較為特殊。

表二、茶樹酯酶同功酶酶帶出現頻度

Table 2 . Frequency of esterase isozyme bands of tea plant.

酶帶編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
酶帶距離 (Rf)	0.12	0.17	0.33	0.36	0.38	0.40	0.42	0.44	0.45	0.47	0.48	0.50	0.52	0.56	0.59	0.63
出現頻度 (%)	86.7	13.3	6.7	73.3	86.7	93.3	33.3	73.3	26.7	86.7	13.3	100	100	53.3	100	100

Rf=0.36、0.44、0.56出現頻度在73.3至53.3%之間，缺少Rf=0.36條帶的品種系有51-34、51-69、51-122、青心大有，又51-69、51-122其親本是由青心大有及台農20號正反交產生，由此可得知青心大有或其後代都可能產生此缺帶，可作為品種鑑定之用。缺少Rf=0.44條帶的品種系有51-67、51-69、青心烏龍、紅心烏龍，缺少Rf=0.56條帶的品種系有51-69、51-122、青心大有、青心烏龍，紅心烏龍、台茶13號、阿薩姆，由此可見在51-69、青心烏龍、紅心烏龍三個品種系中皆無Rf=0.44、0.56這兩個條帶，顯示青心烏龍在雜交時此酶帶可能與另一親本形成互補帶的作用⁽⁴⁾。

特有條帶Rf=0.17、0.33、0.42、0.45、0.48出現頻度則在40%以下，Rf= 0.17為51-122及青心烏龍所特有的條帶，Rf= 0.33只有阿薩姆具有此條帶，51-122、台茶12號、青心大有、台茶6號、紅心烏龍具有Rf=0.42條帶，51-67、51-69、青心烏龍、台茶6號具有Rf=0.45條帶，51-14、51-34、51-67、台茶12號、漢口、台茶13號、大有、台農8號具有Rf=0.48條帶，雖然具有各類特殊條帶，但從電泳圖譜直接作品種系鑑別仍有困難，因此進行其遺傳連鎖群(Linkage cluster)之相似程度(UPGMA)估算，以分析品種系間之親緣關係⁽¹⁾。

表三、茶樹酯酶同功酶之相似度矩陣數值表(Nei's estimate)

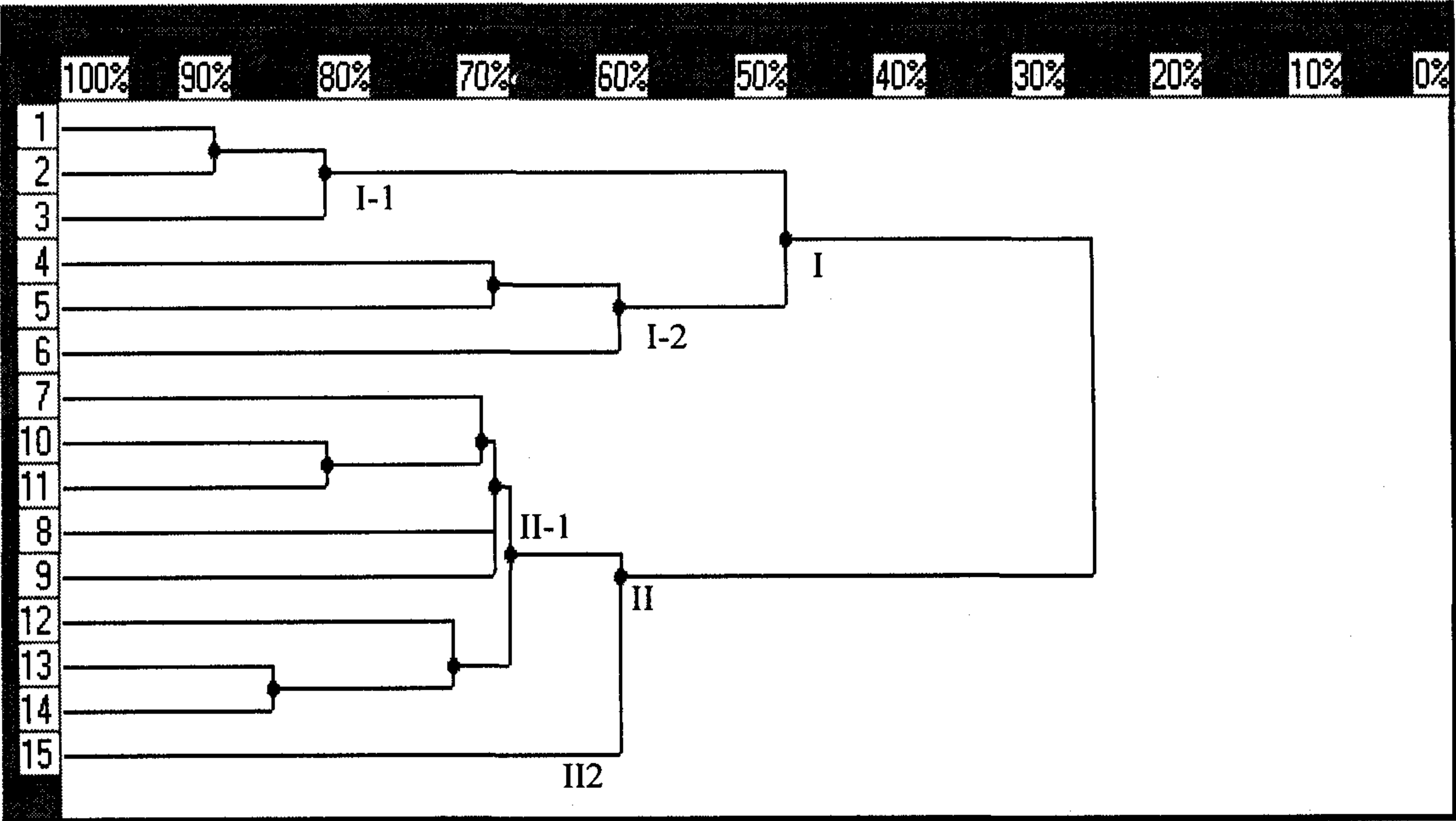
Table 3. Similarity matrix based on Nei's estimate of similarity.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	.90														
3	.82	.70													
4	.60	.56	.80												
5	.45	.40	.55	.70											
6	.45	.30	.55	.60	.64										
7	.29	.32	.38	.53	.57	.67									
8	.29	.21	.38	.42	.48	.48	.70								
9	.50	.45	.50	.45	.42	.50	.70	.70							
10	.48	.42	.38	.42	.29	.48	.70	.70	.78						
11	.43	.38	.35	.38	.35	.52	.73	.73	.64	.82					
12	.29	.21	.29	.32	.29	.57	.70	.60	.61	.70	.73				
13	.27	.30	.27	.30	.27	.45	.67	.48	.58	.57	.61	.76			
14	.29	.32	.29	.32	.29	.48	.70	.50	.61	.60	.64	.70	.86		
15	.19	.21	.19	.32	.29	.48	.60	.40	.52	.60	.55	.60	.67	.80	

1:51-14, 2:51-34, 3:51-67, 4:51-69, 5:51-122, 6:台茶12號, 7:青心大有,8:青心烏龍, 9:台茶6號, 10:紅心烏龍, 11:漢口, 12:台茶13號, 13:大有, 14:台農8號, 15:阿薩姆

圖二. 茶樹酯酶同功酶聚類分析圖

Fig 2. Dendrogram of tea plant listed Table 3, based on average linkage cluster anlysis. Axis on the top of dendrogram indicates percent similarity.



經聚類分析其相似度（Similarity）在40–50%時，可分為兩大類群，以青心烏龍為父本之F₂代選育新品系及台茶12號為一類群(I)，而青心烏龍、青心大有、漢口及其雜交F₁後代為另一類群(II)，並顯示以青心烏龍為雜交父本之F₂代，其與青心烏龍、青心大有、漢口的相似度在30%以下，如圖二。

而在(I) 類群下可再細分兩次類群，51-14、51-34、51-67為一次類群（ I -1），其中51-34、51-67的母本同樣是由大葉烏龍與台農80號雜交所選育的品系2024、2022(如新品系譜系圖)，故其相似度> 80%，親緣相似性極高，而51-69、51-122、台茶12號為另一次類群（ I -2），但從葉片性狀上台茶12號與51-69、51-122茶異性極大，而同功異構酶分析，相似度> 60%，顯見以葉片農藝性狀作區分有時易造成誤判，其中51-69、51-122的母本系由青心大有及台農20號正反交所選育出的品系1778、1792（如新品系譜系圖），故其相似度> 70%。(II) 類群下可再細分兩次類群，以青心烏龍為主的（ II -1）次類群，其中青心大有、紅心烏龍、漢口較近緣，相似度> 70%，而台茶13號、大有、台農8號則較近緣，相似度> 70%，而阿薩姆則自成一次類群（ II -2）。又台茶6號、台農8號都是由青心烏龍天然雜交所選育的種系，由此聚類圖顯示與青心烏龍的相似度> 70%，且台農8號可推測與大有有近緣關係，相似度> 85%，如圖二。

結 論

新品系都以青心烏龍為父本，而母本多為漢口系列之雜交子代(如新品系譜系圖)，結果其子代親緣偏向台茶12號。以51-14為例，其為台茶12號與青心烏龍雜交選育，又台茶12號是由台農8號及硬枝紅心雜交選育，台農8號是由青心烏龍天然雜交所選育，雖經再與青心烏龍雜交，在聚

類分析得知與青心烏龍的相似度 $< 50\%$ ，表示子代性狀上與青心烏龍仍有一段差距。因此建議如欲育成與青心烏龍形質相似的品種，如改以青心烏龍及其近緣之品種系，如台茶6號、台農8號、紅心烏龍等進行雜交，或改以青心烏龍為母本進行雜交育種，其可能之結果，有待進一步深入探討。

誌 謝

本文係承蒙中正農業科技社公益基金86—中基—農—17贊助得以完成，謹致謝忱。

參考文獻

1. 王昭月．1995．同功異構酶與蔗糖增殖多型性 DNA 標誌在番椒品種鑑別之研究．國立中興大學碩士論文．
2. 李文斌、張映南、劉庚峰、賀善文．1989．柑桔矮化砧及半矮化砧過氧化物酶同工酶及活性的比較．園藝學報 16(4):261-265.
3. 林文彬、曾夢蛟、倪正柱．1994．台灣野生梨之復育（二）—分子標誌鑑定．中國園藝 40(4):269-281.
4. 陳春林．1996.茶樹雜交 F1 代同工酶分析．茶葉科學 16(1):31-36.
5. 黃泉源．1954．茶樹栽培學．台灣省茶業傳習所 pp.67-94.
6. 魯成銀、劉為準、李名君．1993．茶樹起源的同工酶初探．中國茶葉 4:10-12.
7. 蕭順元、章文才、陳吉笙、萬蜀淵．1989．利用同工酶鑑定柑桔雜種與遺傳分析的研究．園藝學報 16(4):255-260.
8. Conicella, C., A. F. Saccardo. 1989. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annuum*. Genome 33:279-282.
9. Degani, C. and A. Blumenfeld. 1986. The use of isozyme analysis for differentiation between loquat cultivars. HortScience 21:1457-1458.
10. Granger, A. R., G. R. Clarke and J. F. Jackson. 1993. Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. Theor. Appl. Genet. 86:458-464.
11. Kobayashi, R. S., J. L. Brewbaker and H. Kamemoto. 1987. Identification of *Anthurium andraeanum* cultivars by gel electrophoresis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:164-167.
12. Kennedy, L. S. and P. G. Thompson. 1991. Identification of sweetpotato cultivars using isozyme analysis. HortScience. 26:300-302.
13. Lu, J. and B. Pickersgill. 1993. Isozyme variation and species relationship in peanut and its wild relatives (*Arachis L. Leguminosae*). Theor. Appl. Genet. 85:550-560.
14. Shields, C. R., T. J. Orton, and C. W. Stuber. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissues, pp. 443-468. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier, Amsterdam.
15. Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining, p.469-516. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.).

Isozyme in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier, Amsterdam.

16. Wu, C. T. 1988. Studies on the flush shoot and mature leaf characteristics of the newly registered tea varieties. pp.21-34. In: T. F. Chiu and C. H. Wang (eds.). Recent development in tea production, TTES, Yangmei, Taoyuan, Taiwan, ROC.
17. Xiao, S. Y., W. C. Zhang., J. S. Cheng and S. Y. Wuan. 1995. Inheritance and linkage of isozymes in citrus. *Acta Horticulturae*. 403:189-197.

Study on the Esterase Isozymes and species relationships in tea plant.

You-zenn Tasi*

The gel electrophoresis was used to analyse the esterase isozymes of the F₁ and F₂ hybrids of Chin-shin Oolong , Chin-shin Dapang , Hann-koou . There were fifteen species and strains tested. Results showed that total of sixteen bands was detected among them. The different species and strains had eight to thirteen bands. They included eight fundamental bands of $R_f = 0.12, 0.38, 0.40, 0.47, 0.50, 0.52, 0.59, 0.63$. The frequency of reproducible bands were above 86.7%. The bands of $R_f = 0.36, 0.44, 0.56$ were 73.3%-53.3%. The bands of $R_f = 0.17, 0.33, 0.42, 0.45, 0.48$ were behind 40%.

The Nei's genetic distances of tested species and strains were calculated from R_f values on esterase isozymes. Cluster analysis of this matrix produced a dendrogram which could be separated them into two groups. When the similarity was 40 –50% The F₂ of Chin-shin Oolong and TTES 12 was one group. The F₁ of Chin-shin Oolong , Chin-shin Dapang , Hann-koou and parents were another group. The similarity between groups was below 30%.

* Director, Taiwan Tea Experiment Station , Wen-Shen Substation.