

文章编号: 1000-5692(2000)02-0215-04

茶树品种资源遗传多态性 RAPD 分析

梁月荣¹, 田中淳¹, 武田善行²

(1. 浙江大学茶学系, 浙江杭州 310029; 2. 日本农林水产省蔬菜茶叶试验场, 日本枕崎 14041)

摘要: 探讨了采用 RAPD 分子标记法进行茶树及其近缘种分类和亲缘关系鉴别的可能性。结果表明, RAPD 能有效地区分物种间和茶树种内变种间的差异, 阿萨姆类型茶树和中国类型茶树的特异性 RAPD 分子标记分别为 1 200 bp 的 WKA-24 a 和 610 bp 的 WKA-24 b。日本茶树品种与中国茶树品种具有较近的亲缘关系。部分越南茶树品种为中-印杂种。图 1 表 1 参 4

关键词: 茶树; RAPD; 种质资源; 分类

中图分类号: S571.1 **文献标识码:** A

随机扩增的多态性 DNA (RAPD) 是运用随机引物扩增寻找多态性 DNA 片段, 用以作为分子标记的一种分子生物学研究手段, 具有快速简便等优点。这种技术已渗透于基因组研究的各个方面, 如亲子鉴定、系统发育遗传关系分析、性状关联的分子标记、育种的分子标记辅助选择以及遗传连锁图谱构建等。RAPD 技术在茶树 (*Camellia sinensis*) 遗传育种中也已得到一定的应用, 如茶树遗传资源的评价^[1]、分子遗传图谱构建^[2]和杂交后代的亲子鉴定^[3,4]等。本文对收集于世界各地的茶树品种资源及其近缘种 48 份材料进行了 RAPD 分析, 探讨不同类型茶树品种的特异性 RAPD 分子标记和应用 RAPD 技术进行茶树品种分类的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

本文所用的茶树品种及其近缘种取样于日本农林水产省蔬菜茶叶试验场 (枕崎) 的茶树品种标本园 (表 1)。

1.2 基因组 DNA 提取

取生长正常无病虫害的 1 芽 1 叶茶树新梢, 用水冲洗干净表面异物, 并用吸水纸吸干表面水分, 称取 120 mg 置于研钵中, 加液氮研磨。然后按 Nucleon Phytopure 植物 DNA 提取试剂盒 (Amershan 公司产品) 提供的方法提取基因组 DNA。所得样品在 260 nm 和 280 nm 波长测定质量浓度和纯度后, 用 TE 缓冲液稀释至 200 mg·L⁻¹, 贮于 -30 °C 备用。

1.3 RAPD 分析

选用日本和光纯药公司的随机引物 WKA-24 (CTCCTGCTGTTG) 和 WKA-25 (CTCAGCGATACG) 进行 PCR, 每个反应液 10 μL。其中 H₂O 为 7.0 μL, 5X buffer 2.0 μL, 25 μmol dNTP 0.5 μL, 5×10⁶ μL⁻¹ Ampli-taq 酶 0.1 μL, 0.42 μmol 随机引物 0.2 μL, 200 mg·L⁻¹ 模板 DNA 0.2 μL。反应液经 93 °C 变性处

收稿日期: 1999-11-24; 修回日期: 2000-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39270459); 浙江省自然科学基金资助项目(395073)

作者简介: 梁月荣(1957—), 男, 广西容县人, 教授, 从事茶学及农业与生物技术研究。

理 5.0 min, 在 93 ℃1.0 min, 42 ℃1.5 min, 72 ℃1.0 min 40 循环, 在 72 ℃延伸处理 10.0 min, 最后在 4 ℃下保存。取 PCR 产物 9 μL 于 2%琼脂糖凝胶电泳 (50 mA, 100V)。电泳凝胶经质量浓度为 0.5mg·L⁻¹ 的 EB 溶液染色, 于紫外分析仪下观察并拍照。

表 1 实验材料来源
Table 1 Sources of experimental materials

序 号	品 种 名	来 源	序 号	品 种 名	来 源
1	Ai9	印度	25	Zai-15-2	日本
2	Ai16	印度	26	Zai-66-29	日本
3	Ai20	印度	27	Zai-74-4	日本
4	Ai37	印度	28	Zai-80-19	日本
5	AK 220	印度	29	Zai-116-6	日本
6	AK 226	印度	30	Zai-128-9	日本
7	PKS161	孟加拉国	31	Zai-135-9	日本
8	PKS224	孟加拉国	32	Zai-27763-3	日本
9	Ace37	斯里兰卡	33	Ash	越南
10	SRL9	斯里兰卡	34	Hazan-1	越南
11	SRL34	斯里兰卡	35	Sonkan-1	越南
12	SRL37	斯里兰卡	36	Soizan-4	越南
13	CK17	中国安徽祁门	37	Kag-4	肯尼亚
14	CK20	中国安徽祁门	38	6/8	肯尼亚
15	CP28	中国浙江绍兴	39	31/8	肯尼亚
16	CP29	中国浙江绍兴	40	TN-14-3	肯尼亚
17	CM25	中国江西婺源	41	D99/10	肯尼亚
18	CM26	中国江西婺源	42	S15/10	肯尼亚
19	CN38	中国江西	43	1Nan. T	肯尼亚
20	CN91	中国江西	44	1EP	肯尼亚
21	台湾山茶	中国台湾	45	<i>C. irrawadiensis</i>	日本
22	台湾山茶	中国台湾	46	<i>C. taliensis</i>	日本
23	台湾山茶	中国台湾	47	<i>C. sasanqua</i>	日本
24	台湾山茶	中国台湾	48	<i>C. japonica</i>	日本

2 结果和讨论

RAPD 分析结果表明, WKA-24 引物除对茶树品种 Ash, S15/10, WKA-25 引物对 PKS224 未能扩增出 PCR 产物外, 其余品种均能显示出不同类型的带型, 其中带数最多的为 5 条, 最少的为 2 条。个别品种显带的颜色较浅, 如 PKS224, Zai-116-6 和 31/8 等 3 个品种在引物 WKA-24 扩增下的产物谱带以及 PKS224 在引物 WKA-25 扩增的产物谱带 (图 1)。从带型分析, 物种间的差异明显, 在引物 WKA-25 扩增下所有茶树品种都显示出长度为 1 050 bp 带; 台湾山茶在 WKA-24 引物扩增下出现 560 bp 的 WKA-24c 特异性带, 在引物 WKA-25 扩增下显示出长度为 200bp 的 WKA-25b 带。*C. irrawadiensis*, *C. taliensis*, *C. sasanqua* 和 *C. japonica* 等 4 个茶树近缘种之间没有共同带。同时, 带型在一定程度上反映了物种之间的亲缘关系。产中国台湾的台湾山茶是一种野生茶资源, 在 WKA-24 扩增下, 与中国其他茶树品种资源 CK20, CM26, CN38 和 CN91 拥有长度为 350 bp 的共同带 WKA-24d。印度茶树品种 Ai20, 孟加拉国茶树品种 PKS224, 斯里兰卡茶树品种 SRL34 和 SRL37, 肯尼亚茶树品种 6/8, 31/8, Kag-4, D99/10, 1Nan. T, EP 以及 *C. irrawadiensis*, *C. Taliensis* 和 *C. sasanqua* 也有此带。说明在本研究实验材料中, 这些茶树品种与台湾山茶、*C. irrawadiensis*, *C. taliensis* 和 *C. sasanqua* 可能具有较近的亲缘关系。

在茶树品种资源中, 变种间分别具有不同的特异性带。大多数阿萨姆类型的茶树品种具有长度为 1 200 bp 的 WKA-24 a 带, 如印度的 Ai9, Ai16, Ai20 和 AK226, 孟加拉国的 PKS161, 斯里兰卡的 SRL9 和 SRL37, 越南的 Hazan-1, Sonkan-1 和 Soizan-4, 肯尼亚的 Kag-4, 6/8, 31/8, TN14-3, D99/10 和 1Nan. T 等。

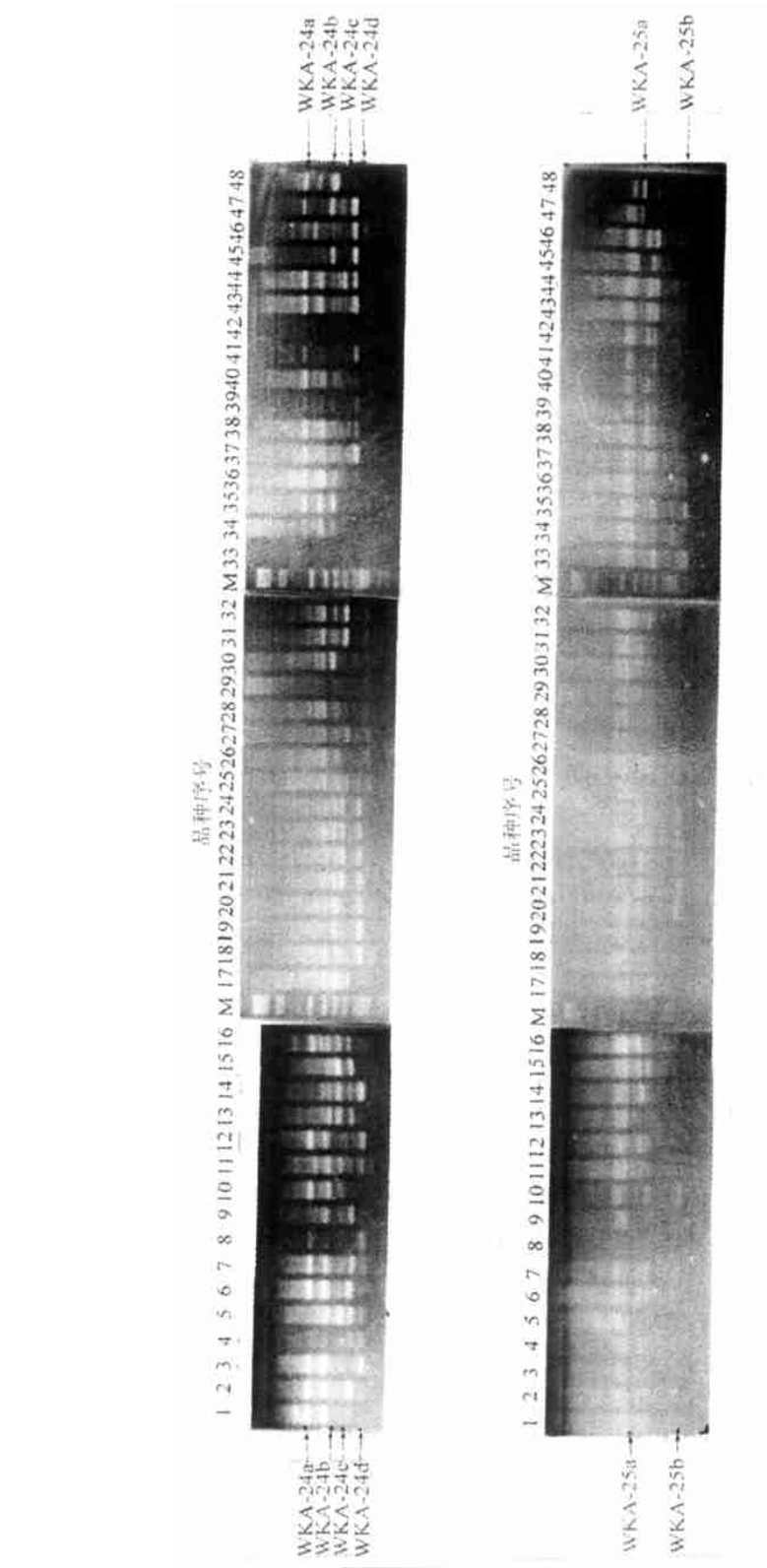


图 1 不同茶树品种资源 RAPD 分析图谱
随机引物：上为 WKA-24；下为 WKA-25
茶树品种资源名称和来源见表 1；M 代表分子量标记 λ mda/Hin III 和 Hinc II 混合物

Figure 1 Electrophoresis diagram of RAPD analysis of various tea varieties
Random prime: upper WKA-24; lower WKA-25

中国茶树品种 CK17, CK20, CP28, CM25, CM26, CN38 和 CN91 都具有长度为 610 bp 的 WKA-24b 带, 同时中国台湾山茶和日本茶树品种 Zai-15-2, Zai-66-29, Zai-74-4, Zai-80-19, Zai-128-9, Zai-135-9, Zai-2776-3, 越南茶树品种 Sonkan-1 和 Soizan-4 以及 *C. irrawadiensis* 和 *C. sasanqua* 也有此带。日本茶树品种除 Zai-66-29 外, 均有 700 bp 的 WKA-25a 带, 中国茶树品种 CK17, CP28, CP29 和 CM25, 斯里兰卡茶树品种 SRL34 以及 *C. sasanqua* 和 *C. japonica* 也有 WKA-25a 带。说明日本茶树品种与中国茶树品种以及 *C. sasanqua* 和 *C. japonica* 具有较近的亲缘关系。而且, CP28 和 CP29 引种于中国浙江绍兴, 也说明日本早期的茶树品种——在来种 (即 Zai 系列品种) 引种于中国浙江是可信的。越南茶树品种 Sonkan-1 和 Soizan-4 同时具有阿萨姆茶树的特征带 WKA-24a 和中国茶树品种的特征带 WKA-24b, 其来源可能是一种中-印杂种, 而 Ash 和 Hazan-1 并非中-印杂种。Hazan-1 可能属于阿萨姆类型茶树。

以上研究结果表明, RAPD 分析能有效地反映出茶树及其近缘种之间的种间差异和种内变种间的特异性。RAPD 作为茶树及其近缘种分类的一种手段是可行的, 而且还可以作为杂种亲本鉴定的技术之一。

参考文献:

- 1 陈亮, 高其康, 杨亚军, 等. 茶树 RAPD 反应系统和扩增程序优化[J]. 茶叶科学, 1998, 18 (1): 16~20.
- 2 田中淳一, 澤井祐典, 山口 聰. チヤにおける RAPD マーカーの連鎖解析[J]. 育種学雑誌, 1995, 45 (1): 198.
- 3 田中淳一, 山口 聰. RAPD によるチヤ品種, の親子関係の検定[J]. 野菜・茶業試験場研究報告 (B 茶業), 1996, 9: 31~36.
- 4 田中淳一, 山口 聰. RAPD 法によるチヤの品種識別と親子鑑別[J]. 育種学雑誌, 1995, 45 (2): 241.

Study on diversity of tea germplasm by RAPD method

LIANG Yue-rong¹, TANAKA Juni-chi², TAKEDA Yoshi-yuki²

(1. Department of Tea Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China;

2. National Institute of Vegetables Ornamental Plants and Tea, Makurazaki 14041, Japan)

Abstract: An RAPD method was used to investigate the possibility of classification and consanguinity identification of *Camellia sinensis* and its close consanguineous species. The results showed that species and variety specificity could be identified by RAPD method. *Camellia sinensis* var. *assamica* and *C. sinensis* had the specific band WKA-24a with 1 200 bp and band WKA-24b with 610bp, respectively. Japanese tea varieties were more closeto Chinese tea varieties. Part of tea varieties from Vietnam was hybrid of *Camellia sinensis* var. *assamica* and *C. sinensis*.

Key words: *Camellia sinensis*; RAPD; germplasm; classification