

云南茶树种质的 RAPD 研究

邵宛芳¹, 庞瑞华², 王平盛³, 许玫³, 段红星¹, 张亚萍¹, 李家华¹

(¹ 云南农业大学茶学系, 昆明 650201; ² 河南省信阳师范学院生物系, 信阳 464000; ³ 云南省农业科学院茶叶研究所, 勐海 666201)

摘要: 利用 RAPD 技术对云南省主要产茶区具有代表性的茶树种质的遗传多样性进行研究。从 40 个随机引物中, 筛选出 8 个扩增效果良好的引物, 用其共扩增出 95 条 DNA 带, 其中 90 条为多态性带, 占 94.7%, 平均每个引物扩增的 DNA 带数为 11.50 条。对 45 个茶树种质间的亲缘关系进行 UPGMA 聚类分析, 结果表明, 当以欧氏距离为 5.0 来划分时, 试验材料可分为 7 个组, 其中 5 个复合组、2 个独立组, 基本上与茶系分类水平相吻合。在 5 个复合组内, 与种级分类水平相吻合, 而 2 个独立组具有独特的种质特性。

关键词: 茶树; 云南; RAPD; 遗传多样性

S57, A

RAPD Analysis of Tea Trees in Yunnan

SHAO Wan-fang¹, PANG Rui-hua², WANG Ping-sheng³, XU Mei³, DUAN Hong-xing¹, ZHANG Ya-ping¹, LI Jia-hua¹

(¹ Tea Department, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; ² Biology Department, Henan Xinyang Normal College, Xinyang 464000; ³ Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Menghai 666201)

Abstract: RAPD assessment on genetic variations of 45 germplasm in teas was carried out. 8 primers selected from 40 random primers were used to amplify 45 tea samples, and a total of 95 DNA bands were amplified, among which 90 (94.7%) were polymorphic. The average number of DNA bands amplified by each primer was 11.50. UPGMA cluster analysis of 95 DNA bands amplified by 8 primers was made. The results showed that all the materials tested could be classified into 7 groups including 5 complex groups and 2 simple groups, which was basically identical with morphological classification, besides these, there were some speciation in 2 simple groups.

Key words: Tea trees; Yunnan; RAPD; Genetic diversity

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 是一种重要的经济作物, 茶叶从最初的药用发展到今天饮用, 已有 5 000 余年的历史, 现已成为一种全球性饮料。大量的野生古茶树的发现与报道, 以及茶树的植物学、生物学、生态学、生物化学、资源学的研究, 都从不同角度证明了云南是世界茶树的起源演化中心^[1]。从现已查明的茶树种质资源看, 云南几乎包罗了一切原始型、过渡型和栽培型茶树。目前世界上已发现的茶组植物有 4 个系, 37 个种, 3 个变种, 而在云南茶组植物就分布有 31 个种, 2 个变种, 其中独有种 24 个, 变种 1 个, 占世界茶种的 80% 以上^[2]。其中一些珍稀资源具有重要的学术研究价值和利用潜力, 在茶树品种改良中具有重要的作用。

目前, 对茶树的研究仍多限于形态学、解剖学及生态学方法^[3,4], 采用 RAPD 标记对茶树种质资源的研究甚少, 且主要集中在一些小叶种茶树 (*C. sinensis*) 或无性系品种上^[5-9]。笔者采用 RAPD 技术, 对云南主要产茶区具有代表性的 45 份茶树种质材料进行研究。旨在从 DNA 分子水平上探讨云南茶树种质资源的亲缘关系, 为进一步发掘和利用云南丰富的茶树种质资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

来自云南省农业科学院茶叶研究所国家种质勐海茶树分圃的材料 26 份, 于冰壶 4℃ 保存, 经 -20℃

收稿日期: 2002-09-05

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2000C0050M)

作者简介: 邵宛芳 (1957-), 女, 云南昆明人, 教授, 主要从事茶叶生物化学、品质鉴评和茶树种质资源的教学及研究。Tel: 0871-5220005; Fax:

0871-5220003; E-mail: shaowf@ynmail.com

贮存预处理后提取 DNA。采自昆明 1999 世界园艺博览会茶园精品区的材料 19 份,直接提取 DNA。供试材料的名称、原产地、学名及种质类型见表 1。

表 1 茶树 45 份试验材料

Table 1 Forty-five varieties of tea trees as experimental materials

| 编号 Serial number | 名称 Name | 原产地 Original place | 学名 Scientific name | 种质类型 Type of germplasm |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|--|---------------------------|
| T-01 | 雪芽 100 Xueya100 | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-02 | 短节白毫 Duanjiebaihao | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-03 | 云梅 Yunmei | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 省级良种 Province variety |
| T-04 | 云抗 10 号 Yunkang10 | 勐海 Menghai | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 国家级良种 State variety |
| T-05 | 云山 1 号 Yunshan1 | 昭通 Zhaotong | 茶 <i>C. sinensis</i> | 育成品种 Variety |
| T-06 | 勐库大叶茶 Mengku-dayecha | 临沧双江 Suangjiang, Lincang | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 国家级良种 State variety |
| T-07 | 昭通苔茶 Zhaotong-taicha | 昭通 Zhaotong | 茶 <i>C. sinensis</i> | 地方品种 Local variety |
| T-08 | 元江糯茶 Yuanjiang-nuocha | 玉溪 Yuxi | 茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>Pubilimba</i> | 地方品种 Local variety |
| T-09 | 云瑰 Yungui | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 省级良种 Province variety |
| T-10 | 长叶白毫 Changyebaihao | 勐海 Menghai | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 省级良种 Province variety |
| T-11 | 矮丰 Aifeng | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 省级良种 Province variety |
| T-12 | 桃形叶 Taoxingye | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-13 | 99 号 No. 99 | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-14 | 波上金苔 Boshangjintai | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-15 | 早圆叶 Zaoyuanye | 思茅 Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-16 | 保洪茶 Baohongcha | 宜良 Yiliang | 茶 <i>C. sinensis</i> | 地方品种 Local variety |
| T-17 | 潞水大叶茶 Mangshuidayecha | 保山昌宁 Changning, Baoshan | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-18 | 底圩茶 Diyuacha | 文山 Wenshan | 底圩茶 <i>C. dihiensis</i> Zhang | 新种 New |
| T-19 | 古茶树 1 号 Old teatree1 | 思茅景迈 Jingmai, Simao | | 野生 Wild |
| T-20 | 古茶树 2 号 Old teatree2 | 思茅景迈 Jingmai, Simao | | 野生 Wild |
| T-21 | 荷花村山茶 Hehuacuncha | 德宏梁河 Lianghe, Dehong | | 近缘植物 Kindred plant |
| T-22 | 黄泥河野茶 Huangnihecha | 曲靖富源 Fuyuan, Qujing | 大厂茶 <i>C. tachangensis</i> Zhang | 新种 New |
| T-23 | 紫鹃 Zijuan | 勐海 Menghai | | 育成品种 Variety |
| T-24 | 84-1-1 | 勐海 Menghai | | 育成品种 Variety |
| T-25 | 南涧 5 号 Nanjian5 | 大理南涧 Nanjian, Dali | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 育成品种 Variety |
| T-26 | 云南特大叶种 Yangnundaye | 勐海 Menghai | | 未鉴定 Unidentified |
| T-27 | 八步茶 Babucha | 文山麻栗坡 Malipo, Wenshan | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-28 | 中山大叶茶 Zhongshan-dayecha | 德宏潞西 Luxi, Dehong | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-29 | 达诺茶 Danocha | 楚雄 Chuxiong | 老黑茶 <i>C. atrothea</i> Zhang | 新种 New |
| T-30 | 中山大叶种 Zhongshan-dayecha | 思茅景谷 Jinggu, Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-31 | 曼喷龙大叶茶 Manpenlongcha | 版纳勐海 Menghai, Banna | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-32 | 豆沙茶 Doushacha | 楚雄盐津 Yanjin, Chuxiong | 茶 <i>C. sinensis</i> | 地方品种 Local variety |
| T-33 | 坝子白毛茶 Baizibaimao | 文山麻栗坡 Malipo, Wenshan | 白毛茶 <i>C. assamica</i> var. <i>pulilimba</i> | 地方品种 Local variety |
| T-34 | 那贝茶 Nabeicha | 文山广南 Guangnan, Wenshan | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-35 | 团田大叶茶 Tuantian-dayecha | 保山腾冲 Tengchong, Baoshan | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-36 | 新华松毛茶 Xinhua-shongmaocha | 曲靖罗平 Luoping, Qujing | 茶 <i>C. sinensis</i> | 地方品种 Local variety |
| T-37 | 大团叶茶 Datuancha | 临沧凤庆 Fengqing, Lincang | | 未鉴定 Unidentified |
| T-38 | 小吉德大叶茶 Xiaogude-dayecha | 大理 Dali | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-39 | 勐库大叶种 Mengku-daye | 临沧双江 Suangjinag, Lincang | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-40 | 马安大茶 Maandacha | 昭通威信 Weixin, Zhaotong | 假秃房茶 <i>C. gymnogynoides</i> | 野生 Wild |
| T-41 | 千龙潭大叶茶 Ganlongtan-dayecha | 大理 Dali | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-42 | 马邓茶 Madengcha | 思茅镇源 Zhenyuan, Simao | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-43 | 富乐毛尖茶 Fule-maojiancha | 曲靖罗平 Luoping, Qujing | 茶 <i>C. sinensis</i> | 地方品种 Local variety |
| T-44 | 金平大叶茶 Jinping-dayecha | 红河金平 Jinping, Honghe | 普洱茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> | 地方品种 Local variety |
| T-45 | 兔街白芽茶 Tujiebaiya | 楚雄 Chuxiong | 元江茶 <i>C. yankiangcha</i> | 地方品种 Local variety |

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 见陈亮等^[10, 11]的方

法。

1.2.2 DNA 的检测 电泳法检测:利用嵌入 DNA

分子中的溴化乙锭受紫外光激发而发射的荧光。荧光强度与 DNA 总量成正比,通过比较样品与标准品的荧光强度,可测定 DNA 的浓度。

紫外分光光度法检测:取 15 μL DNA 稀释 20 倍,用紫外分光光度计(Hitachi UV3000),分别测定样品在 260 和 280 nm 处的光吸收值(OD)。天然双链 DNA 在 260 nm 波长的吸收值与 280 nm 处的吸收值的比值应为 1.8 左右。根据 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值是否在 1.8 左右来判断所提 DNA 的纯度。纯净的核酸制品在 260 nm 波长处有吸收高峰,可根据如下公式计算出提取 DNA 样品的浓度。

$$\text{DNA}(\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}) = (\text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50) / 1\ 000$$

提取后的 DNA 检测后于 -20°C 下保存。

1.3 RAPD 扩增反应

1.3.1 反应体系 采用总体积为 25 μL 的 PCR 反应体系。其中包括购自 Pharmacia Biotech 公司的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1/10 反应体积的 $10\times$ PCR 缓冲液(含 MgCl_2 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.0 U TaqDNA 聚合酶, 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(上海生工生物有限公司), 20~50 ng 模板 DNA。最后加入 20 μL 石蜡油覆盖反应液,在手动离心机上离心 5 s。为了排除污染,每个引物均设阴性对照,用灭菌超纯水代替模板。扩增反应在 Perkin-Elmer 9600 型 PCR 扩增仪上进行。每个引物均进行 2~3 次重复扩增反应。

1.3.2 扩增程序 置于 PCR 扩增仪上的试样,首先 94°C 预变性 3 min,然后 94°C 变性 1 min, 38°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 2 min,共进行 45 个循环,最后 72°C 延伸 5 min,置扩增产物于 4°C 冰箱中保存待测。

1.3.3 扩增产物的检测 将基因组 DNA 的扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭直接加在凝胶中,使其最终 DNA 浓度为 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在电泳仪上,以 60~90 V 电压,电泳 3 h。经电泳过的凝胶于 302 nm 透射紫外灯(Pharmacia Biotech)下观察结果,并拍照。

1.4 扩增产物的分析

1.4.1 DNA 扩增带的统计 用 DL 2 000 作分子量标记,确定反应产物在凝胶上的对应位置。电泳图谱中的每 1 条带(DNA 片段)均作为 1 个分子标记(Marker)。统计时每个引物所有扩增片段按分子量大小的顺序排列。全部材料在重复扩增过程中稳定出现的带无论强弱均赋值为 1^[9, 12],不存在时赋值为 0,并将观测结果制作成 Excel 文件以便用于聚类分析。

1.4.2 遗传多样性数据的处理 RAPD 扩增产物以 0.1 统计在 Excel 中建立数据库,采用聚类分析软件计算材料间欧氏距离,按 Statistic 软件中的非加权组平均法(Unweighted Pair Group with Mathematic Average,UPGMA)对所有供试材料进行系统聚类,建立 DNA 分子片段亲缘关系树状图。计算公式如下:

$$d_{ij} = \left[\sum_{k=1}^m (X_{ik} - X_{jk})^2 \right]^{1/2}$$

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取和检测

采用本试验提取法提取获得的总 DNA 片段,紫外光吸收的测量结果显示大多数 DNA 样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值约为 1.62~1.71,纯度较高,经计算样品浓度为 $200\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 左右。经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),可见条带清晰整齐;与 DNA 相比,所得的 DNA 分子量较大、无 RNA,能满足 RAPD 扩增的要求。

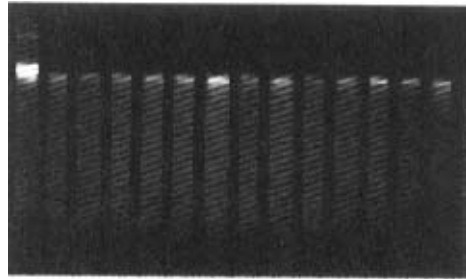


图 1 总 DNA 琼脂糖电泳检测图

Fig.1 Total DNA by agarose gel electrophoresis

2.2 引物的筛选

本试验以 40 个引物(S41-S60, S361-S380)对随机选取的 3 个供试材料分别进行扩增。结果在 40 个引物中,只有 3 个引物 S42、S57、S59 无扩增产物,1 个引物(S365)的产量较少,无法分清条带。12 个引物在 3 个供试材料之间具有多态性。将这 12 个引物分别对全部供试材料进行扩增,最终筛选出在所有供试材料中扩增效果良好的引物共 8 个,分别为 S-45、S-363、S-362、S-50、S-52、S-364、S-366、S-41,占所用引物的 20%。所用引物的序列、编号见表 2。

2.3 RAPD 分子标记结果

本试验从购自上海生工生物工程有限公司的 40 个随机引物中,筛选出 8 个引物可用于 45 份茶树材料的扩增,结果显示良好的多态性(图 2)。在

表 2 引物名称、序列及其扩增结果

Table 2 Name, sequence of primers and results of RAPD amplifying

| 引物 Primes | 序列(5'→3') Sequence | 标记数 Number of plified bands | 多态数 Numbe of polymorphic bands | 多态频率 Frequency of polymorphic bands(%) |
|--------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---|
| S41 | ACCGGAAGG | 9 | 9 | 100.0 |
| S45 | TGAGGGACA | 14 | 13 | 92.9 |
| S50 | GCTCTACACC | 14 | 13 | 92.9 |
| S52 | CACCGTATCC | 14 | 12 | 85.7 |
| S362 | GTCTCCGCAA | 13 | 12 | 92.3 |
| S363 | CCAGCTTAGG | 10 | 10 | 100.0 |
| S364 | CCGCCAAAC | 9 | 9 | 100.0 |
| S366 | CACCTTCCG | 12 | 12 | 100.0 |
| 总数 Total | 8 | 95 | 90 | |

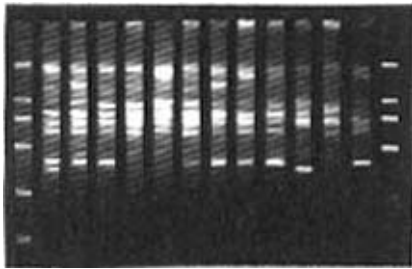


图 2 引物对部分供试材料的 RAPD 扩增电泳图谱

Fig.2 The amplified maps of the primers on part of experimental materials

全部供试材料中总共扩增出 95 条带,引物 S41、S363、S364、S366 扩增出的带均为多态性条带。在所有扩增带中,只有 5 条带是共有的,具体分布为:在引物 S45、S362、S50 中各有 1 条,引物 S52 中有 2 条,共有带仅占总扩增带的 5.3%,多态性程度高达 94.7%。远高于濒危植物银杉(21.5%)^[13]和矮牡丹(22.5%)、紫斑牡丹(27.6%)^[14],同时,也高于肯尼亚茶树种质材料(62%)^[15]和韩国茶树种质材料(84.5%)^[16]。研究结果显示,云南茶树种质资源材料间在 DNA 分子水平上具有十分丰富的遗传多样性。如此高的多态性,与茶树长期的异花授粉所造成的遗传背景复杂,以及云南是茶树的起源演化中心、具有悠久的植茶历史和多样的生态环境有关。

2.4 UPGMA 聚类结果

2.4.1 聚类图与茶系间的亲缘关系 45 份材料经 8 个十聚体随机引物 RAPD 扩增后的二元数据,进行 UPGMA 聚类分析(图 3)。当以欧氏距离为 5 来划分时,可将 45 份材料聚成 7 个组,7 个组是彼此相异的类元,每一类元中汇集了彼此相似的小群,其中包括 5 个复合组和 2 个独立组。

由图 3 可知,复合组 I 共包括 32 份材料,其中

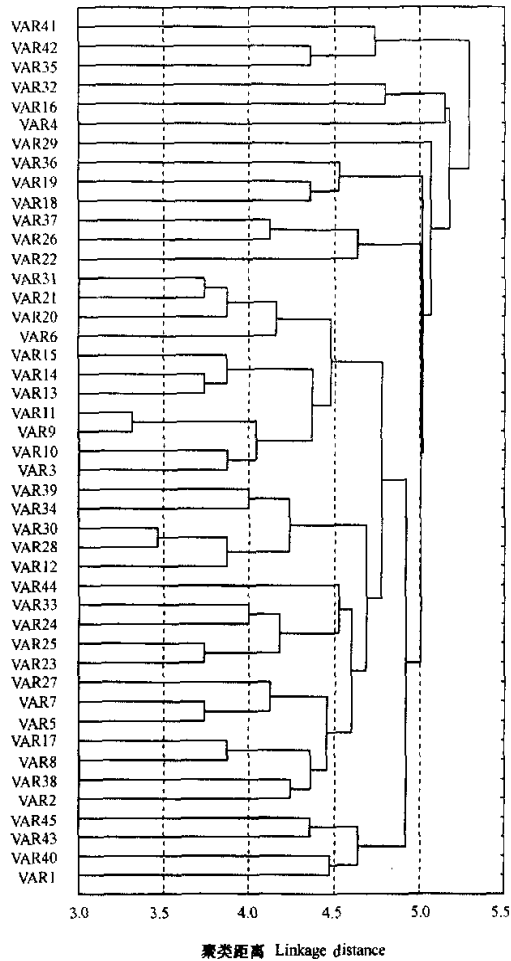


图 3 茶树 45 个品种(种质资源)的 DNA 分子系统树状图

Fig.3 DNA molecular dendrogram of 45 varieties(germplasm) of tea trees

有普洱茶、茶、元江茶、假秃房茶 4 个种和 1 个白毛茶变种,除假秃房茶外都属于茶系,故它们聚到一组

是合理的。本组茶树种质资源或栽培历史悠久,变异类型丰富,或品种特性优异,是宝贵的茶树种质资源材料。

复合组 II 包括黄泥河野茶(大厂茶)、云南特大叶种(未鉴定)、大团叶茶(未鉴定)。在采样中发现,云南特大叶种的叶片较大,并且叶质较脆而厚,属较原始的种类。按照张宏达先生的分类系统及聚类结果,云南特大叶种及大团叶茶均可能属于五室茶系,并具有独特的种质特性。

复合组 III 包括底圩茶(底圩茶)、古茶树 1 号(未鉴定)和新华松毛茶(茶)。底圩茶是茶组植物的一个新种,原产于云南广南县底圩,小乔木型,大叶类。而古茶树 1 号系采自 1999 世博园茶园中具有 800 年树龄的“古茶树”,原产于思茅景迈,小乔木,大叶类。从二者聚类关系相近,说明尽管 2 份材料产自不同地区,但仍具有相似的特性物质。

独立组 IV 只有达诺茶(老黑茶)1 份材料。对照已知谱系,该材料属于五柱茶系。通常认为,五柱茶系是较原始的类型。它的单独成组与传统分类相一致。

在第 V 组中,只有云抗 10 号 1 份材料,其是经鉴定的国家级良种,是 1973 年在原产地云南西双版纳州勐海县遭受多年未遇的冷害后,绝大多数茶树均死亡而其却成活的情况下,自然选育出的一个抗寒性品种。现已广泛种植于云南各主产茶区。2000 年早春,云南滇南茶区曾遭受多年未遇的低温危害,大部分品种的茶树均受到严重危害,而云抗 10 号受害最轻。这表明其是一个抗寒性较好的品种。按已知谱系该材料属于普洱茶(*C. assamica*)。一般而言,小叶种茶树(*C. sinensis*)的抗寒性较强,而该品种的抗寒性甚至较一般小叶种还强,从它的单独成组,以及在聚类图上与其它普洱茶亲缘关系较远,而与小叶茶种的关系较近这一事实,肯定云抗 10 号是一个非常独特的品种,值得将其作为优异种质资源进行深入探讨,以获得更广泛的利用价值。

复合组 VI 包括有性系良种宝洪茶及豆沙茶,二者均属于茶系中的茶种。该类茶属小叶种,通常与大叶茶的亲缘关系较远,构成了遗传物质上的差异,二者在聚类图上未与普洱茶(*C. assamica*)聚在一类的事实,也证明 RAPD 在茶树种质资源分类上的可信度。

复合组 VII 包括有 3 份材料,即干龙潭大叶茶、马邓茶、团田大叶茶。按已知谱系知,该 3 个品种均属于普洱茶。但由图 3 可见,该类群与其它聚在一起

的普洱茶(复合组 I)未成一类,且亲缘关系较远。这一情况或许说明,仅就形态数值对茶树种质资源分类是不全面的。同时表明,云南既然是茶树的原产地之一,其丰富的自然资源必然孕育了丰富的遗传基因。这种多样性只有从 DNA 水平才能较全面地反映出来。这 3 份材料同样值得作为特异种质资源加以保存及进一步研究利用。

聚类图与茶种间的亲缘关系,聚类图与品种间的亲缘关系将在今后作进一步的探讨。

3 讨论与结论

3.1 笔者从 40 个随机引物中筛选出扩增效果良好的 S-41、S-45、S-50、S-52、S-362、S-363、S-364、S-366 共 8 个引物,可直接供茶树种质资源的 RAPD 研究。

3.2 以欧氏距离为 5 来划分时,在 45 份供试材料中共分为 7 个类群,其中复合组 I 包括了 32 份材料,按张氏分类系统属于茶系。新种底圩茶与未鉴定的古茶树 1 号为一类,说明二者与普洱茶相比具有独特的遗传物质。此外,令人感兴趣的是,达诺茶(老黑茶)与云抗 10 号(普洱茶)分别独立成类,其从一个侧面表明这 2 个材料的具有独特性。尤其是云抗 10 号为国家级良种,具有明显的抗寒优势,其无疑是一个特异材料,非常值得进一步深入研究,以利于从 DNA 分子水平方面,为茶树良种选育提供参考依据。而 2 个小叶种(宝洪茶、豆沙茶)聚为一类,并与普洱茶亲缘关系较远这一事实也说明 RAPD 在茶树种质资源分类上的可信度。而本属于普洱茶的 3 份材料(干龙潭大叶茶、马邓茶、团田大叶茶)在图 3 中却未与大多数普洱茶聚为一类,这 3 份材料是否存在特殊的遗传物质,有待进一步研究。这一结果也表明仅以形态数值分类是不完全合理的,而通过 RAPD 技术从 DNA 水平上对茶树种质资源进行组群划分是可行的。

3.3 对云南 45 份茶树种质的研究发现:云南茶树种质资源的多态性程度高达 94.7%,高于肯尼亚(62%)^[15]和韩国(84.5%)^[16]。初步从 DNA 水平证明了上述材料具有更丰富的遗传多样性及特异性,为进一步发掘利用优异茶树种质资源,建立种质资源信息库,培育新良种提供分子生物学依据。

总之,采用 RAPD 技术对茶树种质资源进行研究,可快速准确地鉴定出其所属种或变种,这对及时发现新种,有目的地进行种质资源的保存、利用具有重要的意义。同时 RAPD 技术由于能迅速产生大量的分子位点,其丰富的多态性足以区分形态性状相

似, 亲缘关系很近的品种。通过对 DNA 多态性的检测, 建立茶树种质资源信息库, 将有助于完善和推动我国茶组植物的系统学研究, 并为茶树育种、优势种群构建及良种优势模式的建立提供分子证据, 同时, 还有助于解决很多分类学上有争议的问题。

References

- [1] 陈兴球. 茶树原产地—云南. 昆明: 云南人民出版社, 1986: 4-6.
Chen X Y. *The Original Locality of Tea Plant-Yunnan*. Kunming: Yunnan People Press, 1986; 4-6. (in Chinese)
- [2] 黄桂枢. 中国普洱茶文化研究. 昆明: 云南科技出版社, 1994.
Huang G S. *Studies on The Puer teas Culture in China*. Kunming: Yunnan Scientific and Technology Press, 1994. (in Chinese)
- [3] 王平盛, 许 玫. 云南茶树种质资源主要性状鉴定和评价利用. 云南农业大学学报, 1998, 13(4): 388-391.
Wang P S, Xu M. Comprehensive evaluation of main characters of Yunnan tea germplasm resources. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 1998, 13(4): 388-391. (in Chinese)
- [4] 束际林. 云南三大古茶树叶片解剖结构及花粉形态的研究. 中国茶叶, 1994, 16(3): 15-17.
Shu J L. Studies on leaf anatomy and pollen morphology of the three big old tea trees growing in Yunnan. *China Tea*, 1994, 16(3): 15-17. (in Chinese)
- [5] 陈 亮, 杨亚军, 虞富莲, 高其康, 陈大明. 15 个茶树品种遗传多样性的 RAPD 分析. 茶叶科学, 1998, 18(1): 21-27.
Chen L, Yang Y J, Yu F L, Gao Q K, Chen D M. Genetic diversity of 15 tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] cultivars using RAPD markers. *Journal of Tea Science*, 1998, 18(1): 21-27. (in Chinese)
- [6] 陈 亮, 虞富莲, 杨亚军, 陈大明, 徐昌杰, 高其康. 茶树优质资源遗传稳定性的 RAPD 分析. 茶叶科学, 1999, 19(1): 13-16.
Chen L, Yu F L, Yang Y J, Chen D M, Xu C J, Gao Q K. A study on genetic stability of excellent tea germplasm [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] using RAPD markers. *Journal of Tea Science*, 1999, 19(1): 13-16. (in Chinese)
- [7] Seon H L. Identification of Korean wild tea plants and Japanese green tea cultivars using RAPD markers. *J. Kor. Tea. Sci.* 1995, 1(1): 129-148.
- [8] Wachira F N. Genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD marker. *Genome*, 1995, 38: 201-210.
- [9] Wachira F N, Powell W, Waugh R. An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* (cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified polymorphic DNA and organelle-specific STS. *Heredity*, 1997, 78: 603-611.
- [10] 陈 亮, 陈大明, 高其康, 杨亚军, 虞富莲. 茶树 DNA 的提纯与鉴定. 茶叶科学, 1997, 17(2): 177-181.
Chen L, Chen D M, Gao Q K, Yang Y J, Yu F L. Isolation and appraisal of genomic DNA from tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Journal of Tea Science*, 1997, 17(2): 177-181. (in Chinese)
- [11] 宣 朴, 徐利远, 余桂容, 尹春蓉. 植物 DNA 快速高效提取方法研究. 西南农业学报, 1998, 11(2): 111-114.
Xuan P, Xu L Y, Yu G L, Yin C R. A rapid efficient and reliable method for extraction of plant DNA. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 1998, 11(2): 111-114. (in Chinese)
- [12] Ngoran J A K, Laurent V, Risterucci A M, Lanaud C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* Using RFLP and RAPD markers. *Heredity*, 1994, 73: 589-597.
- [13] 汪小全, 邹喻莘, 张大明, 洪德元. 银杉遗传多样性 RAPD 分析. 中国科学(C 辑), 1996, 26: 436-441.
Wang X Q, Zou Y P, Zhang D M, Hong D Y. Studies on the genetic diversity of *Cathaya argyrophylla* using RAPD markers. *Science in China (Series C)*, 1996, 26: 436-441. (in Chinese)
- [14] 裴颜龙, 邹喻莘, 尹 蓁, 汪小全, 张志宪, 洪德元. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报. 植物分类学报, 1995, 33(4): 350-356.
Pei Y L, Zou Y P, Yin Z, Wang X Q, Zhang Z X, Hong D Y. Preliminary report of RAPD analysis in *paenonia suffruticosa* subsp. *Spontanea* and *Paenonia rockii*. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1995, 33(4): 350-356. (in Chinese)
- [15] Williams J G K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531-6535.
- [16] 吴美贞. 韩国本地茶树间遗传关系及其绿茶理化特性的研究. 韩国高丽大学农学院博士学位论文集, 1994: 27-29.
Wu M Z. Studies on Genetic Relationship Among the Korean Native Tea Trees and Physicochemical Properties of Its Green Tea. The Volume of Doctor Degree Thesis. College of Agronomy. GaoLi University. Korea, 1994: 27-29.

(责任编辑 孙雷心)