

# 应用 RAPD 分子标记鉴定野生茶树种质资源研究

陈亮<sup>1</sup>, 王平盛<sup>2</sup>, 山口聪<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 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; <sup>2</sup> 云南省农业科学院茶叶研究所,勐海 666201; <sup>3</sup> 爱媛大学农学部蔬菜花卉学研究室,日本松山 790-8566)

**摘要:** 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; OPO-13 扩增的 13 种谱带类型可以鉴定 10 份资源。利用最少数量引物获得最大鉴定能力, 对种质资源的分子鉴定尤为重要。OPO-13、OPO-18、OPG-12 和 OPA-13 等 4 个引物带型的组合则可以鉴定所有 24 份资源, 包括形态和生化成分上几乎没有差异的 2 株毗邻野生茶树。

**关键词:** 野生茶树; RAPD 标记; 种质资源

## Identification of Wild Tea Germplasm Resources (*Camellia* sp.) Using RAPD Markers

CHEN Liang<sup>1</sup>, WANG Ping-sheng<sup>2</sup>, Yamaguchi Satoshi<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Tea Chemical Engineering, Ministry of Agriculture/Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008; <sup>2</sup> Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Menghai 666201; <sup>3</sup> Laboratory of Vegetable and Flower Science, Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790-8566, Japan)

**Abstract:** Identification of 24 wild tea germplasm resources using RAPD markers was conducted. The result showed that RAPD was a very effective tool and method in wild tea germplasm discrimination. There were 3 independent ways to identify tea germplasms: a) unique RAPD markers; b) unique band patterns and c) a combination of the band patterns provided by different primers. The presence of 16 unique RAPD markers and the absence of 3 unique markers obtained from 12 primers made it possible to identify 14 germplasms. Using the unique band patterns of primer OPO-13 could identify 10 tea germplasms. It was of much importance using minimum primers to obtain the maximum identification ability. All the 24 wild tea germplasms could be entirely identified by the band patterns combination of primer OPO-13, OPO-18, OPG-12 and OPA-13, including two wild tea trees of very similar morphology and chemical components.

**Key words:** Wild tea trees (*Camellia* sp.); RAPD markers; Germplasm resources

茶树是我国主要木本经济作物之一,在山区、半山区农村经济中有重要地位和价值,尤其在西部大开发中有不可替代的经济、社会和生态意义。中国是茶树的原产地,云南是世界上茶树资源最丰富的地区,野生大茶树主要分布于云南。建立在中

国农业科学院茶叶研究所的国家种质杭州茶树圃和云南省农业科学院茶叶研究所的国家种质勐海茶树分圃作为茶树资源的迁地保存基地,共保存了 2 650 份各类资源,其中杭州茶树圃 1 850 份,勐海茶树分圃 800 份。由于形态性状的连续性,给茶树资源鉴

收稿日期:2002-01-29

基金项目:浙江省“新世纪 151 人才工程”基金资助项目(972062)

作者简介:陈亮(1967-),男,浙江缙云人,副研究员,博士,主要从事茶树种质资源和分子生物学研究。Tel: 0571-86652835; Fax: 0571-86650056; E-mail: tbtri@mail.hz.zj.cn

定带来了许多困难和不便,而生化成分、同工酶等又比较容易受发育阶段、生长环境和栽培措施影响。DNA 分子标记具有不受季节、环境条件影响,数量多、显性或共显性,容易标准化操作等优点<sup>[1]</sup>,在茶树遗传多样性<sup>[2,3]</sup>、亲本鉴定<sup>[4,5]</sup>和遗传作图<sup>[6]</sup>等方面发挥了很好的作用。本文应用 RAPD 标记,对野生茶树资源进行分子标记鉴定研究,为充分评价、积极创新和合理利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为国家种质杭州茶树圃和勐海茶树分圃比较著名和有代表性的 24 份野生茶树资源,其原产地见表 1。采其新梢作为基因组 DNA 提取原料。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 按照陈亮等<sup>[7]</sup>的方法。

**1.2.2 RAPD 扩增** 从 Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, USA) 生产的 A、G、O 等 3 个 kit 共 61 个引物中,依据谱带多态性和重现性筛选出 15 个用于 RAPD 扩增,为验证 RAPD 的可重复性和一致性,对经筛选出的随机引物用同样的反应体系和程序重复 2~3 次,只取重现性好的谱带用于下面的分析。反应程序同陈亮等<sup>[7]</sup>的方法。

**1.2.3 RAPD 产物电泳和观察** 按照陈亮等<sup>[7]</sup>的方法。λEcoT 14 DNA ladder 为 Takara Shuzo Co., Ltd. (Tokyo, Japan) 的产品。RAPD 标记以引物后加谱带编号来表示,如 OPO-13 (1) 表示引物 OPO-13 的第 1 个标记。

## 2 结果与分析

16 个引物在 24 份野生茶树中获得了丰富的多态性。在 107 条可重现的谱带中,有 102 条是多态的,为 95.3%。RAPD 标记不仅揭示了丰富的多态性,而且在鉴定野生茶树资源方面非常有效。有 3 种方法,即特殊的标记、特异的谱带类型和不同引物提供的谱带类型组合,可以有效地鉴定茶树资源。

### 2.1 特殊的标记

表 2 提供了通过特殊的 RAPD 标记可以鉴定的资源。OPO-13 等 12 个引物扩增的 OPO-13 (1) 等 16 个特异标记的存在和 OPA-03 (3) 等 3 个特异标记的缺失,可以鉴定茶房迟生茶、花拉厂茶、大坝大树茶、胜村野茶、浪堤茶、羊岔街野茶、青龙树茶、竹叶青茶 1、丫口小茶、毛肋茶、凤凰大树茶、猪街软茶、小南坪茶和大寺丛茶等 14 份资源。

### 2.2 特异的谱带类型

PCR 扩增后,引物 OPO-13、OPO-18、OPG-12 和 OPA-13 产生了丰富的谱带类型,可以用来鉴定种质资源(表 1、图 1、图 2)。如用 OPO-13 的 13 种谱带类型中的 10 种特异带型可以鉴定其中茶房迟生茶、箐口大树茶、高良野茶、勐稳野茶、花拉厂茶、大坝大树茶、胜村野茶、青龙树茶、丫口小茶和大寺丛茶等 10 份资源(表 1)。

### 2.3 不同引物谱带类型的组合

利用最少数量引物获得最大鉴定能力,对种质资源分子鉴定尤为重要。OPO-13 和 OPO-18 或 OPG-12 等 2 个引物带型组合均可以鉴定 15 份资源(表 1);OPO-13、OPO-18 和 OPG-12 等 3 个引物的带型组合,可以鉴定除竹叶青茶 2、阿伟茶和蚂蚁茶外的 21 份资源(表 1)。OPO-13、OPG-12、OPO-18 和 OPA-13 等 4 个引物带型组合,则可以鉴定所有 24 份茶树资源(表 1、图 1、图 2)。

### 2.4 野生茶树的 DNA 指纹图谱

用 OPO-13、OPG-12、OPO-18 和 OPA-13 等 4 个引物扩增的 22 条可重现的 RAPD 谱带(图 1-B, D;图 2-F, H),可以获得 24 份野生茶树资源的 DNA 指纹图谱(图 3)。每份资源都有惟一的指纹图谱,可以比较容易地相互区分鉴别开来。

## 3 讨论

RAPD 标记用来鉴定种质资源有许多成功的例子。Hu 等<sup>[8]</sup>仅用 4 个 10 碱基的引物就区分开了 14 个绿菜花和 12 个花椰菜品种。Yang 等<sup>[9]</sup>用 RAPD 标记成功地对芹菜品种进行了鉴定和分类。Belaj 等<sup>[10]</sup>用 4 个引物的带型组合就区分出资源圃中 51 份橄榄种质资源。Conner 等<sup>[11]</sup>用 RAPD 鉴定 43 份美洲山核桃资源。郭旺珍等<sup>[12]</sup>利用 1 个引物可以区分 9 个陆地棉主栽品种。

本文结果同样显示,RAPD 标记可以有几种独立的、不同方式来鉴定茶树种质资源。通过特殊的标记,可以鉴定其中 14 份资源;用 OPO-13 特异的谱带类型可以鉴定 10 份资源;而通过 4 个引物的带型组合,或者用其 22 条 RAPD 谱带建立的 DNA 指纹图谱(图 3),可以鉴定所有的 24 份野生茶树资源。其中竹叶青茶 1 和竹叶青茶 2 是原产于云南路西勐嘎三角岩的 2 株毗邻野生大树茶,其植物学形态特征如植株形态、叶片、花果等和主要生化成分几乎没有差别,用常规方法是难以鉴定的,通过 OPO-13/OPO-18/OPG-12/OPA-13 谱带类型的组合就

表 1 野生茶树资源的原产地、RPAD 扩增带型及其鉴定能力

Table 1 The origin of wild tea trees germplasms, RAPD band patterns and their identification capacity

编号 No.	资源 Germplasm	原产地 Origin	OPO-13	OPO-18	OPG-12	OPA-13	OPO-13	OPO-13& OPO-18	OPO-13& OPG-12	OPO-13& OPO-18& OPG-12	OPO-13& OPO-18& OPA-13
1	茶房迟生茶 Chafangchishengcha	云南 Yunnan	A <sup>1)</sup>	A	A	A	√ <sup>2)</sup>	√	√	√	√
2	箐口大树茶 Qingkoudashucha	云南 Yunnan	B	B	B	B	√	√	√	√	√
3	高良野茶 Gaoliangyecha	云南 Yunnan	C	B	A	B	√	√	√	√	√
4	勐德野茶 Mengdeyecha	云南 Yunnan	D	A	C	B	√	√	√	√	√
5	花拉厂茶 Hualachangcha	云南 Yunnan	E	B	C	C	√	√	√	√	√
6	大坝大树茶 Dabadaishucha	云南 Yunnan	F	A	A	B	√	√	√	√	√
7	胜村野茶 Shengcunyecha	云南 Yunnan	G	C	A	B	√	√	√	√	√
8	卡上涩茶 Kashiangsecha	云南 Yunnan	H	D	A	B	— <sup>3)</sup>	√	—	√	√
9	浪堤茶 Langdicha	云南 Yunnan	I	A	A	C	—	—	√	√	√
10	羊岔街野茶 Yangchajieyecha	云南 Yunnan	H	E	A	B	—	√	—	√	√
11	青龙树茶 Qinglongshucha	云南 Yunnan	J	A	A	B	√	√	√	√	√
12	竹叶青茶 2 Zhuyeqingcha 2	云南 Yunnan	I	B	C	D	—	—	—	—	—
13	竹叶青茶 1 Zhuyeqingcha 1	云南 Yunnan	I	D	D	B	—	√	√	√	√
14	阿伟茶 Aweicha	云南 Yunnan	I	B	C	B	—	—	—	—	—
15	桐厂苦茶 Tongchangkuocha	云南 Yunnan	I	B	A	C	—	—	√	√	√
16	丫口小茶 Yakouxiaocha	云南 Yunnan	K	A	A	B	√	√	√	√	√
17	蚂蚁茶 Mayicha	云南 Yunnan	I	B	C	C	—	—	—	—	—
18	毛肋茶 Maoleicha	越南 Viet Nam	I	A	C	B	—	—	√	√	√
19	凤凰大茶树 Fenghuangdashu	广西 Guangxi	L	B	C	B	—	√	√	√	√
20	汝城白毛茶 Ruchengbaimaocha	湖南 Hunan	L	A	B	B	—	√	√	√	√
21	猪街软茶 Zhuojie ruancha	云南 Yunnan	I	F	C	B	—	—	—	—	—
22	小南坪茶 Xiaonanpingcha	云南 Yunnan	I	F	E	B	—	—	√	√	√
23	牛寨高树茶 Niuzhaigao shucha	云南 Yunnan	I	A	F	B	—	—	√	√	√
24	大寺丛茶 Dasongcha	云南 Yunnan	N	B	C	B	√	√	√	√	√
合计 Total			13	6	6	4	10	15	15	21	24

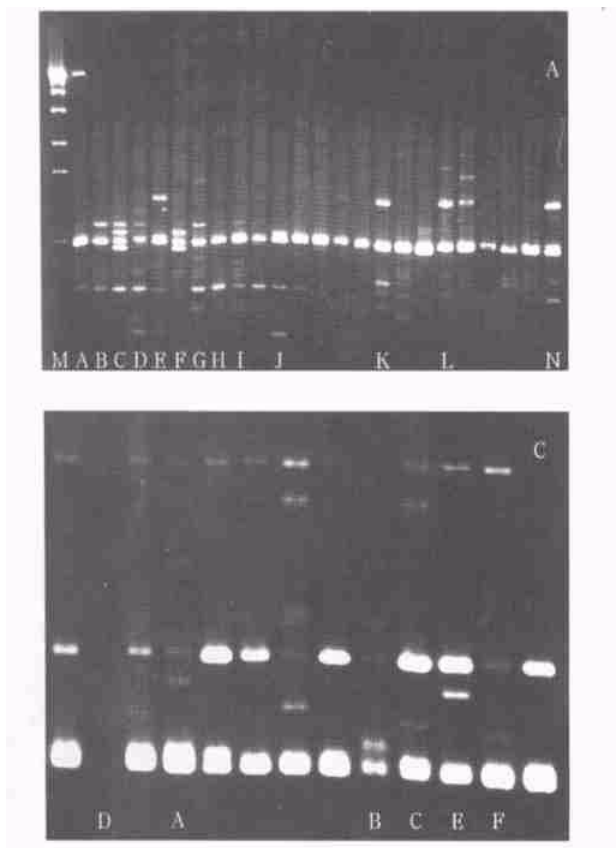
1) 字母代表每个引物的谱带类型; 2) “√”代表该资源可以鉴定; 3) “—”代表该资源未能鉴定

Letters represent the band patterns for each primer; 2) “√” The germplasm could be discriminated by the primer(s); 3) “—” The germplasm could not be discriminated by the primer(s)

表 2 可用特殊标记鉴定的茶树资源

Table 2 Unique markers can be used for discrimination of tea germplasms

特殊标记 Unique marker	鉴定标准 Criteria	能鉴定的资源 Identified germplasms
OPO-13 (1), OPA-13 (1)	存在 Presence	茶房迟生茶 Chafangchishengcha
OPG-14 (1)	存在 Presence	花拉厂茶 Hualachangcha
OPG-07 (1)	存在 Presence	大坝大树茶 Dabadashucha
OPO-18 (1)	存在 Presence	胜村野茶 Shengcunyecha
OPA-03 (3)	缺失 Absence	浪堤茶 Langdicha
OPO-18 (5)	存在 Presence	羊岔街野茶 Yangchajieyecha
OPO-19 (5)	存在 Presence	青龙树茶 Qinglongshucha
OPO-15 (1)	存在 Presence	竹叶青茶 1 Zhuyeqingcha
OPG-12 (4)	缺失 Absence	
OPA-16 (10)	存在 Presence	丫口小茶 Yakouxiaocha
RTG P 2(7), OPG-14 (10)	存在 Presence	毛肋茶 Maoleicha
OPA-14 (6)	存在 Presence	凤凰大茶树 Fenghuangdachashu
RTG P 2(6)	存在 Presence	猪街软茶 Zhujieruancha
OPG-15 (2)	缺失 Absence	
OPG-12 (2), OPO-19 (1)	存在 Presence	小南坪茶 Xiaonanpingcha
OPA-16 (11)	存在 Presence	大寺丛茶 Dasicongcha



底部的字母代表带型, M 为  $\lambda$  Eco T 14 DNA 分子量  
The letters at the bottom correspond to the band patterns. The left first lane is  $\lambda$  Eco T 14 DNA marker

图 1 引物 OPO-13 (A 和 B) 、OPG-12 (C 和 D) 的 RAPD 扩增产物和带型

Fig. 1 RAPD products and schematic of the band patterns with OPO-13 (A and B), OPG-12 (C and D)

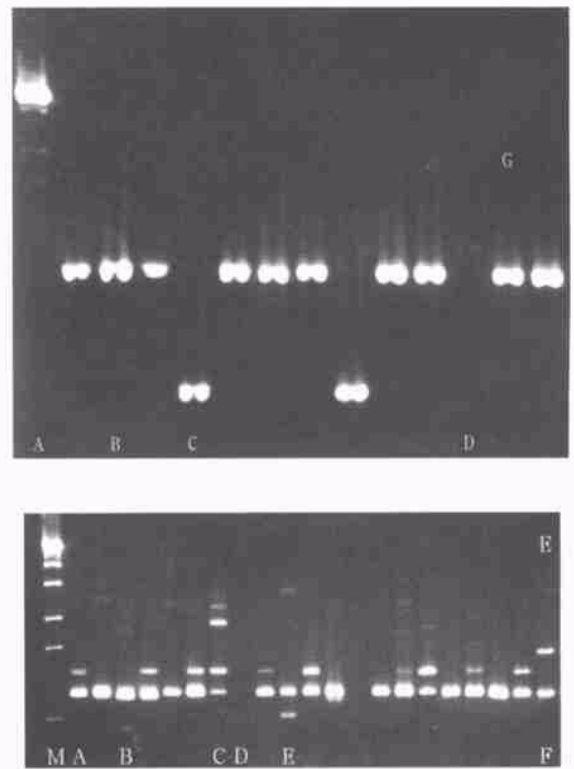
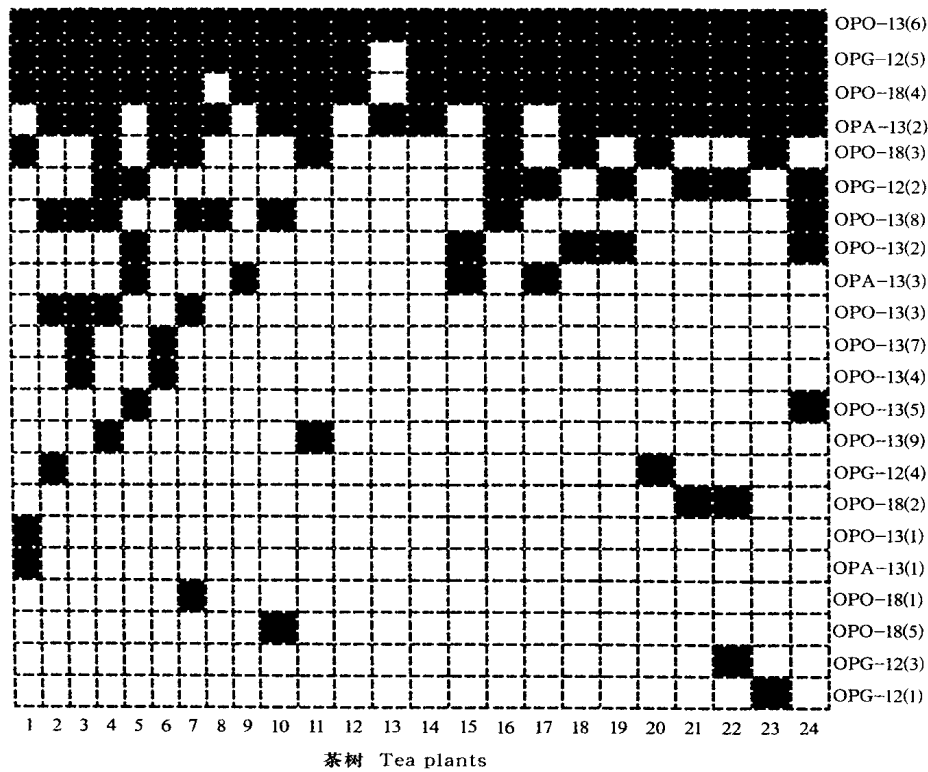


图 2 引物 OPO-18 (E 和 F) 、OPA-13 (G 和 H) 的 RAPD 扩增产物和带型

Fig. 2 RAPD products and schematic of the band patterns with OPO-18 (E and F) and OPA-13 (G and H)

可以把它们鉴定开来。因此,充分利用 RAPD 标记为茶树种质资源的鉴定提供了一个实用、有效的手段和途径。



资源名称详见表1。黑方框代表谱带的存在

Germplasms see Table 1 in detail. Shaded blocks represent the presence of DNA bands

图3 基于RAPD的24份野生茶树资源DNA指纹图谱

Fig.3 DNA fingerprinting of 24 wild tea germplasms based on RAPD data

致谢: 本试验得到日本爱媛大学基因研究中心秋山浩一博士的帮助, 承云南省农业科学院茶叶研究所许玫助理研究员提供研究材料, 在此一并表示谢意。

## References

- [ 1 ] Jia J Z. Molecular germplasm diagnostics and molecular marker-assisted breeding. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996, 29(4): 1 - 10. (in Chinese)  
贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. *中国农业科学*, 1996, 29(4): 1 - 10.
- [ 2 ] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, Powell W. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 1995, 38: 201 - 210.
- [ 3 ] 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. *J. Tea Sci.* 1998, 18(1): 25 - 33.
- [ 4 ] Tanaka J, Yamaguchi N, Nakamura Y. Pollen parent of tea cultivar Sayamakaori with insect and cold resistance may not exist. *Breeding Research*, 2001, 3: 43 - 48. (in Japanese)
- [ 5 ] Tanaka J, Yamaguchi S. Use of RAPD markers for the identification of parentage of tea cultivars. *Bull. Natl. Res. Veg. Ornam. Plants and Tea*, Japan, 1996, B(tea) 9: 31 - 36. (in Japanese)
- [ 6 ] Hackett C A, Wachira F N, Paul S, Powell W, Waugh R. Construction of a genetic linkage map for *Camellia sinensis* (tea). *Heredity*, 2000, 85(4): 346 - 355.
- [ 7 ] Chen L, Yamaguchi S, Wang P S, Xu M, Song W X, Tong Q Q. Genetic polymorphism and molecular phylogeny analysis of section *Thea* in the genus *Camellia* based on random amplified polymorphic DNA markers. *J. Tea Sci.* 2002, 22(1): 19 - 24. (in Chinese)  
陈亮, 山口聪, 王平盛, 许玫, 宋维希, 童启庆. 利用RAPD进行茶组植物遗传多样性和分子系统学分析. *茶叶科学*, 2002, 22(1): 19 - 24.
- [ 8 ] Hu J, Quiros C F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reporter*, 1991, 10: 505 - 511.
- [ 9 ] Yang X, Quiros C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 1993, 86: 205 - 212.
- [ 10 ] Belaj A I, Trujillo R, Rosa L, Rallo, Gimenez M J. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2001, 126(1): 64 - 71.

- [11] Jia J H, Wang P, Jia D M, Qu X P, Wang Q, Li C Y, Weng M L, Wang B. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra*. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(4):403 - 407.
- [12] Conner P J, Wood B W. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2001, 126(4): 474 - 480.
- [13] Guo W Z, Zhang T Z, Pan J J, He J L. Analysis of RAPD fingerprint on main cotton cultivars in China. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1996, 4(2): 129 - 134. (in Chinese)  
郭旺珍,张天真,潘家驹,何金龙. 我国棉花主栽品种的 RAPD 指纹图谱分析. *农业生物技术学报*, 1996, 4(2): 129 - 134.

## 《中国园艺文摘》征稿启事

《中国园艺文摘》是农业部主管、中国农业科学院科技文献信息中心主办的综合类优秀信息期刊,她以精练的文字报道了果树、蔬菜、花卉等领域的科技进展和市场动态,深受业内人士欢迎。主要栏目有:专家论坛、产业视点、市场分析、研究进展、质量标准、国外科技、种植技术、病虫害防治、采后处理、果蔬加工等,欢迎园艺行业科研、管理、生产部门的相关人士投稿。

要求来稿内容真实可靠,文字精练。文稿一般为 1 500 ~ 3 000 字。来稿请注明作者、单位及联系办法,一经录用,我们将通知本人并支付稿酬,两个月内没有回复,作者可另作处理。投稿可用 E-mail 方式,也可信函,最好打印。

地址:北京中国农业科学院科技文献信息中心《中国园艺文摘》编辑部

邮编:100081 电话:010-68919885-2310、2314、2316

E-mail: yan@mail.caas.net.cn

## 欢迎订阅

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊,主要报道粮食作物、经济作物、土壤肥料、植物保护、果树蔬菜、畜牧兽医、特种种植及养殖等方面的研究成果和先进技术。深受省内外农业科技人员、基层干部和农民的喜爱,曾多次得到有关部门的奖励,2000 年被评为“全国农业核心期刊”,连年获河南省优秀科技期刊一等奖。为了满足多层次读者的信息需求,本刊加大了实用技术、科技动态、市场信息的报道力度,以更好地服务于农村经济建设。本刊为月刊,国际标准 16 开本,40 页,彩色封面,每期定价 3.00 元,全年 36.00 元。各地邮局均可订阅,邮发代号:36-32。如错过订期,可直接与本刊编辑部联系订阅。

地址:郑州市农业路 1 号 电话:0371-5739041

邮编:450002 传真:0371-5712747