

茶树高茶氨酸 RAPD 多态性标记研究*

张俊, 王平盛, 季鹏章

(云南省农业科学院茶叶研究所, 云南 勐海 666201)

摘要: 分析了云南大叶种和福鼎白毛茶及其 F₁ 代的 42 品系的茶氨酸含量, 挑选出茶氨酸高含量的 5 个材料与茶氨酸含量低的 5 个材料, 用 140 个随机引物对这 2 组材料进行 RAPD 扩增, 其中 14 个引物在高茶氨酸材料与低茶氨酸材料间可扩增出多态性产物, 为高茶氨酸茶树育种和早期鉴定提供分子水平上的技术支撑。

关键词: 茶树; 茶氨酸; RAPD; 多态性

中图分类号: S 571.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2004)03-0243-03

The Study on the Selection of RAPD Polymorphic Markers with High Theanine Content in Tea Plant

ZHANG Jun, WANG Ping-sheng, JI Peng-zhang

(Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Menghai 666201, China)

Abstract: Theanine content of forty-two tea plant cultivars were analyzed, and then five high and five low theanine cultivars were selected from them. The RAPD cycles with 140 random primers were carried out in the selected cultivars. And 15 primers revealed polymorphisms in these cultivars, a technical method in molecular level was supplied for tea plant early breeding and appraisal of cultivars.

Key words: tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]; theanine; RAPD; polymorphism

云南茶树种质资源丰富, 保存在国家茶树种质资源圃勐海分圃 800 余份, 对于茶树种质资源的研究, 传统生物学观测方法、生理生化分析和细胞遗传学等发挥了主要作用^[1]。但也存在不足, 茶树为多年生异花授粉、自交不育且高度异质化的多年生植物, 许多性状如形态学、生物化学和生理学指标因受环境的影响而呈现出连续性变异或高度的可塑性, 大多数形态学指标甚至受个体发育阶段的影响, 呈现出错综复杂的形态, 这就给种质的正确鉴定和亲缘关系的确定带来困难。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 技术是由 WILLIAMS 等^[2]和 WELSH J 等^[3](1990) 首先创立的一种 DNA 分子标记技术, RAPD 技术具

有快速、简便、通用性好, 对 DNA 的需求量小, 质量要求低等优点。一经问世, 就受到广泛的关注, 并被成功应用于植物、动物、人和微生物的遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、遗传图谱构建、系统学研究等。RAPD 技术的诞生为解决茶树种质的正确鉴定和亲缘关系的鉴定提供了新的途径。在茶树遗传多样性分析、亲缘关系分析、基因定位上已有相关报道^[4-9], 充分证明 RAPD 技术在茶树遗传多样性分析的可行性。茶氨酸是茶叶的一个重要内含成分, 是决定茶叶品质的关键因子, 学名为 N-乙基-γ-L-谷氨酸 (Methy-γ-L-glutamine), 分子式为 C₇H₁₄O₃N₂, 分子量为 174, 在茶汤中溶出率为 80%, 茶氨酸本身是茶汁呈鲜甜味的主要因子,

* 收稿日期: 2003-10-23

基金项目: 云南省农业生物技术重点实验室开放项目资助(99A-20)

作者简介: 张俊(1966-), 男, 云南镇雄人, 副研究员, 从事茶树遗传育种研究。

它与绿茶品质等级呈显著正相关,相关系数为 0.787~0.826,同时也是评价红茶的重要因子。在开展了 42 个茶树杂交品系样品液的茶氨酸含量分析的同时,进行了茶树高茶氨酸 RAPD 多态性引物筛选研究,能为选育和鉴定高茶氨酸茶树品种提供有用的 RAPD 分子标记,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为种植在国家茶树种质资源圃勐海分圃杂交园的云抗 10 号和福鼎大白茶的 F₁ 代 42 品系,取新梢保存于 -70 °C 备用。

1.2 方法

1.2.1 茶氨酸分析方法^[10,11]。

1.2.1.1 标准液的配置

(1) 18 种组分混合氨基酸标准液的配备,采用 TAKARA KOSAN 有限公司生产的氨基酸标准混合液配制。即吸取此标准液 1.2 mL,用 0.02 N 盐酸稀释定容至 50 mL,即得标准氨基酸混合液。(2) 茶氨酸标准溶液的配制:称取茶氨酸晶粉 17.4 mg,用 0.02 N 盐酸溶解并定容至 100 mL,取 3 mL 用 0.02 N 盐酸稀释定容至 50 mL,即得茶氨酸标准液。(3) 氨基酸与茶氨酸混合标准液的配制:取上述 A 和 B 的标准液以不同比例混合配制而成。

1.2.1.2 样品液的配备

精确称取恒重的茶样 0.5 g,用蒸沸的蒸馏水 50 mL 浸泡 15 min,并间歇搅拌数次。用脱脂棉过滤,滤液收集于 50 mL 容量中,茶渣继续用蒸馏水蒸煮,反复操作 4 次以上,合并所有的茶汤,定容在 50 mL 容量瓶中,用移液管量取 2 mL 茶汤,加入 2 mL 磺基水杨酸,定容于 5 mL 容量瓶中,静置 30 min,取上清液 50 mL,即为待测标准样品液。

1.2.1.3 仪器分析条件

标准液的分析,用 835-50 型氨基酸分析仪已配制好的蛋白水解液分析的标准程序对 A 标准液进行 18 种组分的分离和测定;茶氨酸标准样的分析:用标准液 B 在专用程序进行茶氨酸的分析和测定;42 个品系茶汤样品中各种氨基酸的测定:取 50 μ L 样品液在专用程序进行测定。

1.2.2 基因组 DNA 的提取和浓度测定^[4,12,13]

取茶叶新梢 0.5 g,于研钵中加入液氮磨为粉末,加 2 mL 提取液(0.4 mol/L 葡萄糖,3% 可溶性 PVP,10 mol/L Lb 巯基乙醇),研磨成糊状移入 5 mL

离心管中,10 000 r/min 离心 10 min 沉淀再用 2 mL 提取液悬浮,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀再用 2 mL 裂解液(0.1 mol/L Tris pH 8.0,10 mmol/L EDTA,0.5 mol/L NaCl,1.5% SDS)裂解,65 °C 保温 1 h,加入 2 mL 氯仿:异戊醇:乙醇(80:4:16,V:V:V)混匀,室温静置 10 min,10 000 r/min 离心 10 min;上清液转入新 5 mL 离心管中,加入等体积异丙醇,混匀放置 15 min,用玻棒钩出 DNA 絮团,无菌滤纸吸干,转入 0.5 mL TE 中(10 mol/L Tris pH 8.0,1 mmol/L EDTA pH 8.0)中,加入到等体积酚:氯仿混匀,12 000 r/min 离心 10 min,上清液转入 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2)及 2 倍体积乙醇,-20 °C 放置 30 min;用玻棒钩出 DNA,70% 乙醇漂洗后溶于 500 μ L 超纯水 TE 中,取 10 mL 稀释到 500 μ L 测定 A_{260/280};另取 4 μ L 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 片段大小,其余 -20 °C 保存。

1.2.3 RAPD 扩增

扩增反应在 MJ/PTC-200 智能型热循环仪(基因有限公司)上进行,反应体积为 25 μ L。其成分为 25~50 ng 模板 DNA,0.2 μ mol/L 引物,10 * PCR/Mg²⁺ Buffer,0.2 mmol/L dNTPs,1.0 - UTag DNA 聚合酶,不足部份以超纯水补足。扩增程序为:94 °C 预变性 3 min,一个循环;94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 3 min,72 °C 延伸 2 min,共 40 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外透射反射仪上观察、拍照。PCR 所用引物购自北京同正生物发展有限公司。

1.2.4 用 140 个随机引物对高茶氨酸和低茶氨酸材料分别进行 RAPD 扩增。

2 结果与分析

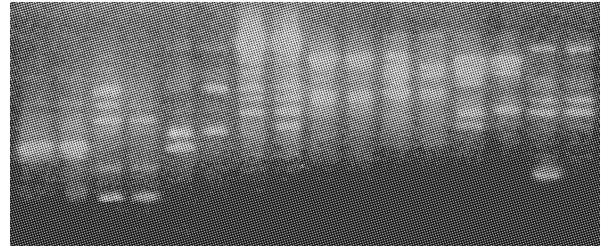
(1) 分离得到的茶氨酸含量的最高 5 个品系为 8-1,8-10,8-11,9-4,10-12,平均含量为 929.30 mg/100 g;茶氨酸含量最低的 5 个品系为 4-18,8-9,8-13,9-7,9-9,平均含量为 298.41 mg/100 g。

(2) 成功地从云抗 10 号和福鼎大白茶及其 F₁ 代的样品中提取并纯化了茶树 DNA,根据 A₂₆₀ 计算了 DNA 的得率,A_{260/280} 计算其纯度为 1.6~1.9 之间;得率较高为 9-15 品系 337.2 ng/mg,较低为 8-8 品系得率为 135 ng/mg,得率平均为 200 ng/mg。0.8% 琼脂糖凝胶电泳,主带清晰明亮,降解少,经

比较茶树 DNA 片段均大于 21 kb,适宜进行 RAPD 扩增。RAPD 扩增带清晰,可发现同一引物在不同品系之间存在着差异和多态性,适于进行茶树的遗传分析。

(3)通过实验发现多数引物在二组材料间的扩增结果不理想,淘汰了无扩增带和扩增后无多态性带的引物,选留那些条带清晰且又能在高茶氨酸和低茶氨酸材料间产生明显多态性产物,如图 1 所示。如此共筛选出 14 个引物,它们的名称和氨基酸序列见表 1。

OPB11 OPB10 OPB08 OPB07 OPB06 OPB05 OPB04 OPB03
1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2



1 低茶氨酸品系;2 高茶氨酸品系
图 1 与高茶氨酸相关的多态性 RAPD 标记(OPB-07)
Fig. 1 The RAPD polymorphic markers(OPB-07) relate to high theanine

表 1 茶树高茶氨酸 RAPD 多态性引物及其核苷酸序列表(5'-3')

Tab. 1 The RAPD polymorphic primers of high theanine contents in tea plant and 10 oligonucleotide sequences

引物	序列	引物	序列	引物	序列
OPA01	CAGGCCCTTC	OPB04	GGACTGGAGT	OPB16	TTTGCCCGGA
OPA04	AATCGGGCTG	OPB05	TGCCCCCTTC	OPB17	AGGGAACGAG
OPA05	AGGGGTCTTC	OPB08	GTCCACACGG	OPB20	GGACCCTTAC
OPA08	GTCACGTAGG	OPB10	CTGCTGGGAC	OPD04	TCTGGTGAGG
OPB03	CATCCCCCTG	OPB12	CCTTGACGCA		

3 讨论

从实验结果发现在这些呈现出多态性的引物中,OPB07,OPB20 等引物表现出与高茶氨酸呈正相关的多态性。OPB03,OPB04,OPB05,OPB08,OPB10 等引物则表现出与高茶氨酸呈负相关的多态性,这从一个侧面说明与茶氨酸相关的基因为数量性状,和田中淳一^[5]的观点相符。由于数量性状易受外界环境条件的影响,在数量性状遗传育种、遗传多样性分析、种质资源的创新与鉴定,以前由于缺乏足够的遗传标记,影响了数量性状研究的进展。以致长期以来有关数量性状基因如茶氨酸含量基因的数目、基因位点、作用效果都不清楚,从而影响了数量性状基因在种质资源遗传多样性、种质资源的创新与鉴定和育种实践^[14,15]。RAPD,RFLP 等分子标记有:能够覆盖整个基因组,标记数量众多,选择响应高,所需 DNA 量少等诸多优点,使育种家有可能依据植株基因型而不是表现型来选择优良性状组合。综上所述,RAPD 等分子标记在茶树种质遗传多样性分析、种质资源的创新与鉴定、甚至茶树早期育种都能发挥巨大的作用,弥补了传统方法的不足。

[参 考 文 献]

[1] 云南省茶科所资源课题组. 云南茶树优质资源综合性状评价[J]. 云南茶叶,1996,(3-4):25-29.
 [2] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18: 6531-6534.
 [3] WELSH J, MCCLEUAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitray primers[J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18: 7213-7218.
 [4] 陈亮,陈大明,高其康,等. 茶树基因组 DNA 提纯与鉴定[J]. 茶叶科学,1997,17(2):177-181.
 [5] 田中淳一,渡部育夫. チャの成叶のテアニン含量の QTL 解析[J]. 茶研报,1996,84(别):46-47.
 [6] 陈亮. 茶树 RAPD 反应系统和扩增程序优化[J]. 茶叶科学,1998,18(1):16-20.
 [7] 陈亮. 15 个茶树品种遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 茶叶科学,1998,18(1):21-27.
 [8] 唐绍清,施苏华,林海波. 几种因素对山茶属植物 RAPD 分析的扩增的影响[J]. 广西植物,1998,18(2):185-188.

(下转第259页)

- [9] OLSON E N. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage[J]. *Dev Biol*, 1992, 154: 261 – 272.
- [10] KARIM L, COPPIETERS W. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay[J]. *Anim Genet*, 2000, 31(6): 396 – 399
- [11] SASSOON D A. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis [J]. *Dev Biol.*, 1993, 156: 11 – 23.
- [12] HUGHES S M. Running without regulators[J]. *Nature*, 1992, 360: 536 – 537.
- [13] SMITH J A, LEWIS A M. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon[J]. *Anim Genet*, 2000, 31(5): 306 – 309.
- [14] CASAS E, STONE R T, KKKLE J W, et al. . A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene[J]. *J Anim Sci*, 2001, 79(4): 854 – 860.
- [15] DICKMAN S. Gene mutation provides more meat on the hoof[J]. *Science*, 1997, 277(5 334): 1 922 – 1 933.
- [16] 张玉静, 欧阳红生, 阮承迈, 等. 分子遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [17] J 萨姆鲁克, EF 弗里奇. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1998.

=====

(上接第245页)

- [9] WACHIRA F N. Genetic diversity in tea revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers[J]. *Tea*, 1996, 12(2): 60 – 68.
- [10] 季鹏章, 周家齐, 张俊, 等. 42个茶树杂交品系茶氨酸含量的氨基酸自动分析[J]. *昆明理工大学学报*, 2002, 27(增刊): 513 – 516.
- [11] 张虹. 应用氨基酸自动分析仪测定茶中氨基酸的组成[J]. *茶业通报*, 1982, (5): 6 – 10.
- [12] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. *浙江农业大学学报*, 1997, 23(6): 123 – 126.
- [13] 季鹏章, 鄢波, 张俊, 等. 茶树杂交品系 DNA 提取与 RAPD 扩增研究[A], 2002 中国青年农业科学学术年报[C]. 中国农业出版社, 2002. 313 – 316.
- [14] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. *中国科学(B 辑)*, 1993, 23(6): 589 – 594.
- [15] 莫惠栋. 数量遗传学的新发展——数量性状基因图谱的构建和应用[J]. *中国农业科学*, 1996, 29(2): 8 – 16.