

書 報 研 讀

題目： Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers

利用 **AFLP** 分子標記分析印度與肯亞茶樹族群的歧異度與遺傳分化

作者： S. Paul, F. N. Wachira, W. Powell, R. Waugh

出處： Theor Appl Genet (1997) 94: 255~263

指導老師： 王裕文老師

報告學生： 蔡依真

報告日期： 89 年 11 月 2 日

報告時間： 上午 11 時

報告地點： 農藝系館 112 室

摘要

AFLP 分子標記已經成功的被利用在探索印度與肯亞茶(*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze)族群的歧異度與遺傳分化。Shanon 歧異度指數被用來區分族群間跟族群內的表現型變異。在族群內發現有大量的歧異度，平均有 79%的歧異度在族群內，而有 21%的歧異度在印度與肯亞茶樹族群間。由擁有共同條帶為基礎所構成的樹狀圖，可以明顯的將茶樹區隔為中國型(*sinensis*)，阿薩姆型(*assamica*)跟高棉型(*assamica* ssp. *lasiocalyx*)三個族群。這個結果是與目前利用譜系以及地理來源的茶樹分類方法相符合的。主成份多變量分析(PCO)把從印度和肯亞來的阿薩姆基因型區分在同一群，所以本分析結果支持了肯亞的品系是從印度地區收集之材料源起的推論。在 PCO 座標圖上，中國型的茶顯示出較分散的點，即是反映出中國型的茶有比較寬廣的遺傳變異。同時，由 PCO 座標圖可以推想出，從相同地區收集到的品系大體上會顯示出較低的遺傳變異。AFLP 分析可以區別從印度和肯亞來的所有參試基因型，甚至一些利用形態學以及外表型的性狀無法區別的基因型，都可以用 AFLP 分析區別。

前言

東南亞是茶樹最初的發源地(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)，而中國是第一個把茶當作飲料的國家。直至現在，茶已經變成流通於全球的大眾化飲料。幾乎對所有茶樹生產國而言，茶是一項對地方經濟很可觀的收

入來源，在印度當然也是如此。印度遺傳種源的收集起源於1823年Robert Bruce發現了阿薩姆型的茶(Singh 1979)。其後才有從緬甸、中國、高棉、越南以及日本收集的遺傳種源。這些遺傳種源的收集讓印度開發優良的栽培材料，進而使其它茶樹栽培國家透過優良遺傳種源的交換贈與，也獲得開發優良的栽培材料。因此世界茶樹栽種面積的基本栽培材料大多是直接或間接接受從印度來的廣大茶樹遺傳質(Ukers 1935)。雖然中國型被引進印度的時間比發現阿薩姆型的時間早，但是主要被轉移去其他國家的卻是阿薩姆型。

根據植物分類法(Barua 1965)，有三種東南亞地理區域原產的栽培種，分別是中國、阿薩姆、以及印度支那。前兩種已被認為是確定的種，為*Camellia sinensis* L. and *C. assamica* Masters。而第三種已知是南方國家或是高棉種類，被視為是阿薩姆型的亞種，在1962 Wight 將其名為*Camellia assamica* subsp. *Lasiocalyx* (Planch MS)。中國型的特徵是擁有小葉片而耐冷的灌木，阿薩姆型則是大型葉片較不耐冷之高大樹木(Sealy 1958)。而高棉型(Kingdom-Ward 1950; Roberts et al. 1958)被認為是介在中國和阿薩姆型之間。一般而言，不論茶的分類差異有多少，所有茶都被分類為 *C. sinensis* (L.)O. Kuntze的物種(Sealy 1937, 1958; Barua 1965; Visser 1969)。

茶是一個高度異質性的異交作物，也因如此導致其生態群從極端的中國型植株擴展到遠源的阿薩姆血統 (Wight 1959)。雜交變異程度如此的大，導致常被討論到原型的 *C. sinensis*，*C. assamica* 或 *C. assamica* ssp. *lasiocalyx* 是否仍然存在(Visser 1969)。而關於現存的茶樹族群是經由這三個主要的分類自由雜交所形成的，或是否有其他 *Camellia* species 牽涉其中，也仍有爭議(Wood and Barua 1958; Cannell et al. 1977)。許多明顯的種間雜交個體，仍依照其外表上的相似性而被分類為阿薩姆，高棉或中國型(Banerjee 1992)。

任何育種或遺傳保育問題的成功，都依賴對出現在基因庫的遺傳變異之數量與分佈的瞭解。傳統上測量遺傳的歧異度，都是利用型態學跟農藝性狀的結合來測量。不過，茶樹是一個擁有許多部分相同之型態，生化以及生理上特性的異質性植物(Purseglove 1968; Wickremasinghe 1979 ; Banerjee 1988b)。另外，因為大多數的營養器官性狀都會受到環境因素的影響，而呈現出一個連續的變異跟高度的彈性，故要以此分辨出明確的分類群體已被證明是有困難的(Wickramaratne 1981)。再者，已經被識別的分類群也可能無法反映出真實的遺傳相似度。為了試圖去克服這些問題，生化以及分子上的技術已經被用來監測遺傳的變異度(Wachira et al. 1994)。同功酶就已經被廣泛的利用在描述植物的遺傳資源(Jana and Pietrak 1988; Chengyin et al. 1992; Jelinski and Cheliak 1992)，但是

卻受限於相對低程度的可察覺多型性。限制片段長度多型性(RFLPs)克服了這個問題，而且也已經被用來研究栽培植物與其野生親屬的遺傳歧異度(Tanksley *et al.* 1989; Miller and Tanksley 1990; Wang *et al.* 1992)。不過，RFLP分析需要大量高純度的DNA，而且這個方法經常都是用放射性同位素來檢定，使得在分析大量樣品時，對技術、勞力及費用的需求龐大。由聚合酵素連鎖反應為基礎(PCR-based)的核酸隨機增殖多型性(RAPD)分析(Williams *et al.* 1990; Welsh and McClelland 1990; Hu and Quiros 1992; Wilde *et al.* 1992; Chalmers *et al.* 1992; Russell *et al.* 1993; Dawson *et al.* 1995; Wachira *et al.* 1995)克服了許多RFLPs技術上的限制因素。但是卻發現其對實驗的條件敏感，因此分析結果的重現性就成為問題。增殖片段長度多型性(AFLPs)，是最近一個新的以聚合酵素連鎖反應為基礎(PCR-based)的植物DNA指紋分析技術，由其發展的結果顯示其具有大量的DNA多型性(Vos *et al.* 1995)。初期的報告(Meksem *et al.* 1995; Becker *et al.* 1995)指出，AFLP是一個可靠而且穩定的遺傳分子標記分析方法。每個反應中AFLPs所發現的多型性數都比RFLPs或RAPDs所發現的高出很多，這是因為單一次分析中取樣的基因座數較多的緣故。AFLPs提供了機會對大量的生物體或物種之間，進行詳細的遺傳研究。在這篇研究報告中，我們將會應用AFLPs研究在茶樹族群間以及族群內的遺傳變異。

材料與方法

植物材料

本研究的材料包含由印度和肯亞不同地方收集而來的32個基因型(表一)。有15個基因型(號碼1 – 15)的葉片樣本是由印度Palampur, Kangra的茶葉試驗所收集來的, 而有17個基因型(號碼16 – 32)是從肯亞Kericho的茶葉研究機構收集而來。

DNA萃取

DNA是由冷凍乾燥的葉片利用修改過的Gawel和Jarret在1991年發表的方法萃取。冷凍乾燥的葉子材料(2克)在加入液態氮及不溶的polyclar AT 400毫克, 使用杵和研鉢將其磨成細微的粉末。再加入已經預熱至65度C的100毫升萃取緩衝液(2% CTAB, 100 mM TRIS-HCl, pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1% DTT)。讓樣品在65度C持續搖動處理30分鐘之後, 加入chloroform比isoamyl alcohol為24:1的溶液75毫升, 以8000轉(Sorvall RC5C) 離心5分鐘, 然後透過幾層的薄紗布過濾, 收集上清液。接著加入同體積的冰冷propan-2-ol, 讓其留在室溫10分鐘以沈澱出DNA。以每分鐘5000轉離心10分鐘, 丟棄上清液之後, 保留沈澱的DNA團塊, 然後將其真空乾燥。將乾燥過後的DNA團塊溶於2毫升的TE buffer (10 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)。在加入20ul的RNase A (10 mg/ml)之後, 將樣品置於65度C下處理15分鐘, 之後將其儲存在4度C。再經由Eppendorf microfuge以14000轉離心5分鐘將其中不溶解的物質移除, 而

上清液則移到乾淨的管子內。而後DNA再以2倍體積的冰冷酒精再次沈澱，離心，真空乾燥後，溶於TE buffer，最後將這些樣品儲存在4度C。

AFLP

切割DNA

AFLP的操作步驟是根據小幅修改的Keygene N.V.(Zabeau and Vos 1993)操作步驟進行。2.5毫克的DNA用12.5 U *EcoRI*，12.5 U *MseI* 和10毫升的5 X restriction-ligation buffer (50 mM TRIS-acetate，50 mM magnesium acetate，250 mM potassium acetate，25 mM DTT，and 0.25 ug/ul BSA)在37度C下作用1小時來切割。之後，在反應終了了的50 ul體積中取出10 ul的被切割DNA跑1.5%之瓊脂膠片，來確認完全的切割。

轉接子之黏接

轉接子黏接的操作，是加入5 pmol *EcoRI*轉接子，50 -pmol *MseI* 轉接子，0.96 ul 10 mM ATP，1 U T4-DNA黏接酵素，0.8 ml 的10 X restriction-ligation buffer以及無菌水到雙切割的DNA樣品(最終體積60 ul) 中，並且讓其在37度C下溫育3小時。全部被使用的引子轉接子序列都附在表二中。

前增殖

要進行前增殖的模版要有與轉接子核心序列（表二）互補的引子才能執行

增殖。因此，已經切割過也黏接好的2 ul DNA加入75 ng EO1引子，75 ng MO1引子，1 U *Taq* DNA聚合酵素(Perkin Elmer, USA)，2.5 ml of 10 X PCR buffer (Perkin Elmer, USA)以及0.2 mM dNTPs，使反應最終體積為24ul。PCR反應是以Perkin Elmer-9600的熱循環(Perkin Elmer, USA)機進行，使用的溫度處理如下：30個循環94度C30秒鐘，60度C30秒鐘，72度C60秒。加入55 ul 10X buffer(10 mM TRIS, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) 到每個樣品之後，由前增殖的DNA中取15 ul，以1%瓊脂膠片分析DNA片段，透過0.2kb片段大小的擴散條帶區確認前增殖的結果。

末端標定

只有與EcoRI相容的引子會被標定。準備足夠進行35個選擇性增殖反應的引子。其配製方法為3.5 ul γ -[³²P] ATP (1.11×10^{14} Bq/mmol)，3.5 ul 10 X T4 buffer (250 mM TRIS·HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM spermidine)，4.7 ul E (加入3個選擇性核苷酸)引子(50 ng/ul stock)，0.9 ul T4 kinase (10 units/ml) 以及 22.4 ul的水(最終體積 35 ul)。之後樣品在37度C下處理30分鐘，再加熱至70度C維持10分鐘來停止這個反應。

選擇性PCR增殖

選擇性限制片段增殖由一個[³²P]-標定的EcoRI + 3引子，以及一個沒有標定的MseI + 3引子(表二)來進行。每個20 ul的PCR反應含有3 ul前增殖的

DNA, 50 ng 標定的 *EcoRI*+3 引子, 50 ng 沒有標定的 *EcoRI*+3 引子, 50 ng 沒有標定的 *MseI*+3 引子, 2 mM dNTP, 0.1 ul Taq DNA 聚合酵素 (10 units/ul) 以及 2ul PCR buffer (Perkin Elmer, USA)。下面的溫度處理條件可提供最理想的引子選擇性: 1個循環 94度C 30秒, 65度C 30秒, 72度C 60秒。再跟著 11個循環的反應, 在此反應步驟中, 每一個循環中的黏合溫度都較前一循環低 0.7度C。結束後再緊接著進行下列溫度處理, 23個循環 94度C 30秒, 56度C 30秒, 72度C 60秒。

膠體電泳

PCR產物加入了 20ul formamide loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.005% each of xylene cyanol FF and bromophenol blue), 然後經由在 90度下處理 5分鐘使 DNA 由雙股變單股。接著加入 65毫升 6% Easigel (Scotlab), 450ul 10% ammonium persulphate, 去除氣泡及加入 20ul TEMED 來製作 6% 的 polyacrylamide 膠體。在加入樣品四小時前, 就必須將膠片製作完成, 然後用 80 W 預跑 30分鐘。5ul 的樣品裝入梳孔中, 然後讓膠片用 80W 跑 1.45小時。之後轉印到 3 MM 的色層分析紙, 在膠體乾燥機上用 80度C 乾燥 2小時。最後讓膠體以 X光底片曝光 4至7天。

資料分析

在放射線底片上會得到出現或是不存在的條帶。定量多型性的程度可以用

Shannon基因型歧異度指數表示：

$$H_o = - \sum \pi_i \ln \pi_i$$

這裡的 π_i 是指基因型 i 的頻度(King and Schaal 1989)。 H_o 可以計算來比較族群間的差異。

令

$$H_{pop} = 1/n \sum H_o$$

此為 n 個族群間的平均歧異度。

令

$$H_{sp} = - \sum \pi \ln \pi$$

此為考慮全部族群基因型頻度的歧異度估計值。

族群內歧異度的比率為 H_{pop} / H_{sp} ，而族群間的歧異度估值則為 $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 。

基因型間的相似度估值是以某一個基因型的增殖片段同時在另一個基因型出現的機率(Nei and Li 1979)：

$$D_{AB} = 2 \times \text{共同擁有的片段數目} \div (\text{片段A數目} + \text{片段B數目})$$

主成分多變量分析和單一連結成群分析(Kempton and McNicol 1990)是以GENSTAT 5(1987)統計套裝軟體進行分析。

結果與討論

32個茶樹基因型的AFLP指紋分析以5個組合的引子分析(E33/M39，

E34/M39, E37/M32, E42/M39 and E46/M32;其序列在表二中), 展現了總數73個清楚的多型性之增殖DNA片段。平均而言, 每一個引子組合就得到15個多型性位置。圖一顯示了用E37/M32 ($E_{acg}M_{aac}$)引子組合的PCR反應之後得到的指紋分析。發現得到的多型性之增殖片段大小範圍在106 – 218 bp之間。

將5個組合的引子所偵測到的基因型頻度計算後, 用來估算族群內的歧異度(H_0)。高棉型族群顯示出最低的族群內變異, 但是其族群是最小的一個而影響到 H_0 的估值。中國型和阿薩姆型族群都顯示出高度的族群內變異。當把全部從印度和肯亞來的基因型分群後, 兩個族群都顯示出高度的族群內變異(表三)。Shannon基因型歧異度指數接著用來區分族群內跟族群間的歧異度。用 H_{pop} / H_{sp} , 估計出現在族群內的歧異度部分, 而用 $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 估計群間的歧異度, 平均而言, 有79%的變異來自在印度型和肯亞型茶族群內的差異, 而有21%的變異來自族群間的差異(表四)。當再依照茶樹型類別細分, 有58%歧異度在中國、阿薩姆和高棉型族群內, 而有42%在族群間(表五)。這個研究的結果與異交木本植物的觀察一致, 其保留相當大的變異度, 而且大多數變異在族群內表現(Hamrick 1990)。在族群內遺傳歧異度的估計中, 中國型的茶樹有最大的變異量。重要的是, 之前肯亞茶被認為是以在一個地方雜交來的後裔為基礎的, 這個地方可能應該就

是阿薩姆；而我們估計之肯亞茶族群內的歧異度也與對印度族群做的觀察非常相似。這支持了Wachira以及其他人的觀察，在1995年他們用RAPD分子標記在肯亞茶發現大量的遺傳歧異度。以共同出現的片段為基礎做出的表六相似度矩陣，可以被用來表示在印度茶和肯亞茶基因型之間或其各自族群內的關係。由表六可以看出，在印度族群內，其相似度的範圍從T-253和M-51之間的0.41到M-6和M-93之間的0.85；在肯亞族群內的範圍則由6/8和301/2的0.41到BB35和BB21的0.96。再看印度和肯亞的基因型相似度範圍，由14/1和M-51，471/15和M-51，以及6/8和C-124之間都是0.35到BB35和Samsingh之間的0.87。

圖二是以共同出現的片段作為基礎的樹狀圖，將32個基因型劃分成阿薩姆、中國和高棉三型。這普遍與現存的茶樹分類知識以及一些品系跟雜交子代的譜系資料相符合。但是由樹狀圖區分後，印度材料中的T-253和Samsingh，以及肯亞材料中的TN 14/3，4/28和56/89都不符合此分類方式。不過他們的分類是根據易受環境改變的型態標記。有關肯亞材料的這個例外，在之前1995年就被Wachira等人以RAPD分析為基礎報導過。很有可能是這型態性狀的基因型是雜種（異型結合），造成其容易接受其被鑑定為中國型茶。

P-312，Kangra Asha，M-6，M-93，M-18，C-37，C-124，C-33和K. Purple，9個中國基因型被分在同一群，明顯地與阿薩姆分開，這與外型

上的差異符合。三個高棉基因型301/2，301/3和14/1形成一個在中國型和阿薩姆型之間的個別一群。Wachira等人在1995年也報告到301/2和301/3是同屬於高棉群，但是14/1卻是報告為中國型，這與現在的發現形成對比。這個原因到目前都還是不清楚的。

圖三的最首要的兩個主成份多變量座標分析可以解釋33%的變異以及有效的區分其品系間差異以及配合地域的分佈。(圖三)

從這主成份多變量分析(PCO)座標圖可以將阿薩姆、中國和高棉型清楚的區分。另外，得到的中國型M-6，M-18，M-51，M-93以及C-33，C-37，C-124是從相同農場的不同地區來的，於是在中國型的群內形成了次級的小群，這也清楚的顯示出地域上的次分化。‘Kangra Asha’和‘Kangra Jwala’是從茶葉試驗所選拔出來的，在Kangra Valley地區推廣的品種。這兩個品種用AFLPs分析發現有很大的差異(相似度=0.55)，而且也沒有被分在同一群內。‘Kangra Jwala’是類似阿薩姆型的品種。農場早期從阿薩姆來的栽培材料，被引進Kangra Valley，逢機地種在已有的中國型植株裡面。‘Kangra Jwala’可能因此表現出最初種在中國型旁邊的引進阿薩姆型，而之後就被鑑定成本地的‘Kangra Valley’選拔種。對照之下，‘Kangra Asha’則類似其他的本地選系，並且被認為最初是緣起於中國型。看高棉群內的301/2和301/3兩個都是由留尼旺來的選系。

從印度跟肯亞來的阿薩姆品系在PCO座標圖中顯示出很靠近在一起的群集。這可能保證了肯亞茶是來自印度，因而顯示出共同的血統。在PCO座標圖中中國型是較分散的，也就是反映出廣泛的遺傳變異。然而，從相同地理區域收集來的材料(M和C系列)顯示出高度的相似度，那是因為在相同的天然族群中選拔的。這些觀察大致上和用RAPD分子標記(Wachira *et al.* 1995)以及RFLP分子標記(D. Chamberlain and P. Jack, PBI, Cambridge, England, 私人通訊)一致。總之，AFLP似乎扮演了另外一個可以被應用到遺傳歧異度分析以及茶樹族群遺傳的分子多型性標識。並且因其可以有效的使用在植物遺傳質的特性描述及分析，所以作為一系列以PCR為基礎之重要的方法代表。

參考文獻

- Banerjee B (1988) Dry matter production and partitioning by tea varieties under differential pruning. *Appl Agric Res* 3:326 – 328
- Banerjee B (1992) Botanical classification of tea. In: Wilson KC, Clifford MN (eds) *Tea: cultivation to consumption*. Chapman & Hall, London, pp 25 – 51
- Barua DN (1965) Classification of the tea plant: species hybrids. *Two Bud* 12:13 – 27
- Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, Heun M (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 249:65 – 73
- Cannel MGR, Njuguna CK, Ford ED (1977) Variation in yield among competing individuals within mixed genotype stands of tea: a selection problem. *J Appl Ecol* 14:969 – 985
- Chalmers KJ, Sprent JI, Simons AJ, Waugh R, Powell W (1992) Patterns of genetic diversity in a tropical tree legume (*Gliricidia*) revealed by RAPD markers. *Heredity* 69:465 – 472
- Chengyin L, Weihua L, Mingjum L (1992) Relationship between the evolutionary relatives and the variation of esterase isozymes in tea plant. *J*

- Dawson IK, Simons AJ, Waugh R, Powell W (1995) Diversity and genetic differentiation among sub-populations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity* 74:10 – 18
- Gawel NJ, Jarret RL (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomea*. *Plant Mol Biol Rep* 9:262 – 266
- GENSTAT 5 Committee (1987) GENSTAT 5 reference manual. Clarendon Press, Oxford
- Hamrick JL (1990) Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: Soltis ED, Soltis PS (eds) *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall, London, pp 87 – 105
- Hu J, Quiros CF (1992) Identification of broccoli and cauliflower with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10:505 – 554
- Jana S, Pietrzak LN (1988) Comparative assessment of genetic diversity in wild and primitive cultivated barley in a center of diversity. *Genetics* 119:981 – 990
- Jelinski DE, Cheliak WM (1992) Genetic diversity and spatial subdivision of *Populus tremuloides* (Salicaceae) in a heterogeneous landscape. *Am J Bot* 79:728 – 736
- Kempton R, McNicol JW (1990) Graphical methods for multivariate data: teaching notes. Scottish Agricultural Statistics Service, Scottish Crop Research Institute, Dundee, UK
- King LM, Schaal BA (1989) Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* 42:1117 – 1119
- Kingdom-Ward F (1950) Does wild tea exist? *Nature* 165:297 – 299
- Meksem K, Leister D, Peleman J, Zabeau M, Salamini F, Gebhardt C (1995) A high resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet* 249:74 – 81
- Miller JC, Tanksley SD (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* 80:437 – 448
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5267 – 5273
- Purseglove JW (1968) *Tropical crops: dicotyledons*, vol. 2. Longmans Green, London
- Roberts EAH, Wight W, Wood DJ (1958) Paper chromatography as an aid to

- the identification of *Thea camellias*. *New Phytol* 57:211 – 225
- Russell JR, Hosein F, Johnson E, Waugh R, Powell W (1993) Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol Ecol* 2:89 – 97
- Sealy J (1937) Species of *Camellia* in cultivation. *J R Hortic Soc* 62:352 – 369
- Sealy J (1958) A revision of the genus *Camellia*. R Horti Soc, London
- Singh ID (1979) Indian tea germplasm and its contribution to the world's tea industry. *Two Bud* 26:23 – 26
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *BioTechnology* 7:257 – 264
- Ukers WH (1935) All about tea. vol. 1. The Tea and Coffee Trade Journal Company, New York
- Visser T (1969) Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. In: Ferwarda FP, Veenman FWith, Zonen NV (eds) Outline of perennial crop breeding in the tropics. Wageningen, The Netherlands, pp 459 – 493
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Freijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407 – 4414
- Wachira FN, Waugh R, Hackett CA, Powell W (1995) Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome* 38:201 – 210
- Wang ZY, Second G, Tanksley SD (1992) Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor Appl Genet* 83:565 – 581
- Welsh J, McClelland, M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213 – 7218
- Wickremaratne MR (1981) Variation in some leaf characteristics in tea (*Camellia sinensis* L.) and their use in the identification of clones. *Tea Q* 50:183 – 189
- Wickremasinghe RL (1979) Tea. In: Mrak EM, Steward GF (eds) Advances in food research, vol. 24. Academic Press, New York, pp 229 – 286
- Wight W (1959) Nomenclature and classification of the tea plant. *Nature*: 183, 1726 – 1728
- Wight W (1962) Tea classification revised. *Curr Sci* 31:298 – 299
- Wilde J, Waugh R, Powell W (1992) Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl*

Genet 83:871 – 877

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531 – 6535

Wood DJ, Barua DN (1958) Species hybrids of tea. *Nature* 181: 1674 – 1675

Zabeau M, Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application of 92402629 (Publ. No. 0 534 858 A1)