

文章编号: 1001-3776 (2016) 03-0019-05

人工绘制品种鉴别图法鉴定榧树属植物

于华平¹, 赵 鹏¹, 程晓建¹, 王燕飞², 徐伟军²

(1. 浙江广播电视大学农学院, 浙江 杭州 310030; 2. 浙江省龙泉市林场, 浙江 龙泉 323700)

摘要: 以 19 个榧树属植物的嫩叶为试验材料, 采用改良 CTAB 法进行 DNA 提取, 选用 11 个碱基组成的随机引物并筛选退火温度对其进行随机扩增的 DNA 多态性 (RAPD) 分析, 根据特异性谱带构建相应的图谱关系, 通过人工绘制品种鉴别图法 (MCID), 快速、准确鉴别这 19 个榧树属植物。

关键词: MCID; 榧属; RAPD; 鉴定

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Identification of *Torreya* Arn. by MCID Method

YU Hua-ping¹, ZHAO Li¹, CHENG Xiao-jian¹, WANG Yan-fei², XU Wei-jun²

(1. College of Agriculture, Zhejiang Radio & Television University, Hangzhou 310030, China;

2. Longquan Forest Farm of Zhejiang, Longquan 323700, China)

Abstract: Random primers with the composition of 11 bases were selected for RAPD amplification of 19 species and cultivars of *Torreya* Arn., and corresponding map relationships were built according to the specific bands. Species were identified quickly and efficiently through drawing the diagram manual cultivar identification diagram (MCID).

Key words: MCID method; *Torreya* Arn.; RAPD; identification

榧树属 (*Torreya*) 植物分布于北半球, 北美产 2 种, 日本 1 种, 中国 4 种。榧树 (*T. grandis*) 为我国特有树种, 其栽培种香榧 (*T. grandis* cv. *Merrillii*) 更是重要的经济树种, 具有很高的观赏价值和综合利用价值。近年来, 随着各地快速发展, 它的产量和经济效益也明显提高, 在不断的栽培和引种过程中, 优良品种和性状也越来越多, 这使得良种的区分也更加困难。因此, 快速有效的鉴别榧树属植物对于它的生产经营、品种选育以及良种进化都有着重要的意义。

对于榧树属植物品种的研究, 经历了从宏观的传统形态学研究到微观的细胞学鉴定再到比较精确的分子标记鉴定。传统的形态学品种鉴定方法由于受到环境条件和自身发育的影响不适于众多品种的区分鉴定; 而在细胞水平上主要研究香榧的染色体组成、性别早期鉴定以及雌雄株的核型等方面。DNA 分子标记由于具有标记数量众多、简单、快速、不受时空和环境影响等特点, 在品种鉴定方面有着无可比拟的优势^[1~3]。谭晓风等^[4]利用 RAPD 技术对 8 个香榧栽培品种进行系统的聚类分析, 结果与传统形态学分类基本吻合; 张党权^[5]同样也对主栽的 8 个品种进行了系统聚类, 并进行品种划分; 戴正等^[6]利用筛选出的 12 条引物分析多个实生品种和优良无性系的遗传关系。李红等^[7]从 RAPD 技术入手构建了香榧的分子遗传图谱。这些研究仅对品种的遗传关系进行了分析, 并没有直接区分大量的品种, 而且利用计算机聚类分析获得的进化树无法将多态性标记与品种的区分建

收稿日期: 2016-01-22; 修回日期: 2016-04-18

基金项目: 浙江省教育厅科研项目“基于 DNA 标记的人工示意图法鉴定香榧品种” (Y201328649)

作者简介: 于华平 (1986-), 女, 山东威海人, 讲师, 从事果树应用基因组学研究, Email: yuhuaping@zjtvu.edu.cn。

立直接的联系。

人工绘制品种鉴别示意图法^[8-9](manual cultivar identification diagram, MCID)是基于 DNA 标记的新方法,不仅可以利用较少的引物将品种区分开来,而且还可以快速的从品种鉴别示意图上利用不同的引物和谱带的有无鉴定不同品种,能够将丰富的 DNA 标记信息转化成可用于鉴定大量品种资源的有效信息。该方法在枇杷(*Eriobotrya japonica*)、杏(*Armeniaca vulgaris*)、梅(*Armeniaca mume*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等果树上已经适用。Zhang 等^[9]用了 6 个随机引物成功鉴定 25 个枇杷品种,并建立了 MCID 图。Wang 等^[8]利用 MCID 法将 54 个花梅品种区分开来,而且仅用了 17 对杏与果梅的 EST-SSR 引物。张晓莹等^[10]用 7 次 PCR 就能够将 191 个葡萄品种区分开来。王玉娟等^[11]利用 MCID 法鉴定了 72 个葡萄品种。

人工绘制品种鉴别示意图法,操作简便,实用性强,应用在榧树属上,对今后苗木早期鉴定、品种权利保护^[12]、生产中品种的区分、命名等研究都可以提供技术性指导。

1 材料与方法

1.1 材料的选取

在香榧胚乳、幼果、老叶和嫩叶上对 DNA 提取进行比较试验,结果表明嫩叶上提取的效果较好^[13]。因此,本研究以榧树属植物嫩叶为试验材料,试验材料均采于浙江农林大学香榧资源圃,共 19 个榧树属植物,材料编码与名称见表 1。

表 1 实验所用榧属植物名称
Table 1 Plants for test

编号	树种和品种	编号	树种和品种
1	香榧 6 号 <i>Torreya grandis</i> 'Xiangfei 6'	11	新昌 1 号 <i>T. grandis</i> 'Xinchang 3'
2	舌叶榧 <i>T. grandis</i> 'Sheyefei'	12	香榧 14 号 <i>T. grandis</i> 'Xiangfei 14'
3	九龙山榧 <i>T. grandis</i> var. <i>jiulongshanensis</i>	13	香榧 4 号 <i>T. grandis</i> 'Xiangfei 4'
4	浦江 4 号 <i>T. grandis</i> 'Pujiang 4'	14	珍珠榧 <i>T. grandis</i> 'Zhenzhufei'
5	巴山榧 <i>T. fargesii</i>	15	芝麻榧 <i>T. grandis</i> 'Zhimafei'
6	象牙榧 <i>T. grandis</i> 'Xiangyafei'	16	香榧 11 号 <i>T. grandis</i> 'Xiangfei 11'
7	香榧 29 号 <i>T. grandis</i> 'Xiangfei 29'	17	新昌 3 号 <i>T. grandis</i> 'Xinchang 3'
8	香榧 12 号 <i>T. grandis</i> 'Xiangfei 12'	18	榧树雄株 <i>T. grandis</i> (♂)
9	龙凤香榧 <i>T. grandis</i> 'Longfengxiangfei'	19	巴山榧雄株 <i>T. fargesii</i> (♂)
10	浦江 5 号 <i>T. grandis</i> 'Pujiang 5'		

1.2 方法

1.2.1 榧树属植物嫩叶 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[14]进行 DNA 提取。

1.2.2 引物及退火温度筛选 根据引物长度对 RAPD 扩增效果影响的研究结果,在众多果树树种上 11 个碱基的引物要比 9 和 10 个碱基的引物的扩增效果好^[15]。因此,本试验采用 11 个碱基的引物用于榧树属植物的品种鉴定。同时,在 35~45℃ 设置温度梯度,对随机引物进行退火温度筛选,从中筛选出了 5 个引物(见表 2)。通过琼脂糖凝胶检测,把谱带重复出现、清晰、杂带较少的温度作为退火温度。

1.2.3 用 MCID 法快速鉴定品种 对 19 个榧树属植物的 PCR 扩增结果进行分析,根据特异性谱带的有无建立品种区分图谱,快速鉴别品种。

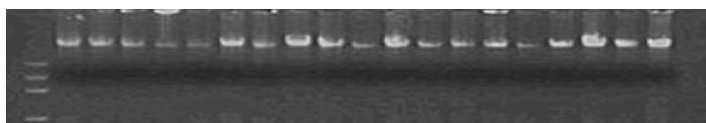
2 结果与分析

2.1 榧树属植物嫩叶 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取的嫩叶的 DNA 质量较好,可用于日后的扩增,见图 1。

2.2 引物筛选

根据引物的筛选条件即选择 11 个碱基且梯度 PCR 扩增条带稳定清晰的温度作为退火



从左到右依次为 1~19 个榧树属植物

图 1 19 个榧树属植物 DNA 电泳示意图

Figure 1 DNA electrophoresis patterns of tested plants

温度，从 36 个随机引物中筛选出 5 条 11 个碱基的引物，见表 2。从表 2 可知，这些引物扩增的结果稳定性和多态性都较好，符合后期品种鉴定的扩增要求。

2.3 DNA 指纹图谱统计以及品种鉴别的人工绘图

表 2 引物及其退火温度		
Table 2 RAPD primers and annealing temperature		
引物编号	引物序列 (5' →3')	退火温度/℃
Y-3	GTTTCGCTCCA	44.3
Y-6	GTTTCGCTCCC	43.7
Y-10	CTGCTGGGACT	42.8
Y-57	ACCCCCGACTA	44.3
Y-60	ACCCCCGACTC	44.8

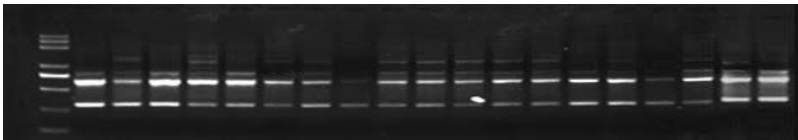


图 2 用引物 Y3 扩增的榧树属的 19 个榧树属植物的指纹图谱
Figure 2 Banding patterns of tested plants amplified by primer Y3

根据所筛选的某一条引物对所有榧树属植物的扩增结果，把具有相同扩增谱带的品种划分在一组，不相同的划分为另一组；如果其中某一品种单独具有或不具有某一特征谱带，该品种就可以被单独区分鉴别出来。利用更多的引物将每一组的品种按照上述的方法逐步进行鉴定，直至每个品种都被单独区分出来^[11]。最后，将所利用的引物和多态性谱带的大小（bp）绘制成榧树属植物鉴定图（图 3）。

从图 3 可以看出，利用引物 Y3 对 19 个榧树属植物进行扩增，根据 800 bp 的特征性谱带的有无将所测植物分成 2 组。第一组象牙榧、香榧 12 号、芝麻榧、香榧 11 号都没有 800 bp（-）特征谱带；第二组香榧 6 号、舌叶榧、九龙山榧、浦江 4 号、巴山榧、香榧 29 号、龙凤香榧、浦江 5 号、新昌 1 号、香榧 14 号、香榧 4 号、珍珠榧、新昌 3 号、榧树雄株、巴山榧雄株有 800 bp（+）特征谱带；其中第一组的 4 个种再利用引物 Y10 进行区分，象牙榧和香榧 12 号根据在 1 200 bp 和 500 bp 上多态性谱带的有无被区分出来，芝麻榧和香榧 11 号由于谱带一致被分为一组。芝麻榧和香榧 11 号用引物 Y6 在 750 bp 上谱带的有无区分开来。第二组的 15 个种利用 1 300 bp、1 500 bp、800 bp、600 bp 和 750 bp 谱带的有无分成七 7 个亚组：香榧 6 号具有单独的谱带 600 bp、浦江 4 号具有单独的谱带 750 bp 被单独区分开来，舌叶榧、巴山榧、新昌 1 号在 1 500 bp、1 300 bp 和 800 bp 谱带上的有无被单独区分。九龙山榧、龙凤香榧、香榧 14 号、香榧 4 号、新昌 3 号、榧树雄株、巴山榧雄株被分为一个组，香榧 29 号、浦江 5 号、珍珠榧为一个组，这两个亚组都具有 500 bp 和 700 bp 两个谱带，但在 800 bp 和 1 500 bp 两个谱带上的差异使两组区分开来。其次用相同的方法用引物 Y57 将两个亚组区分开来，最后利用引物 Y60 将香榧 14 号、巴山榧雄株和香榧 4 号、新昌 3 号分别区分开来。

3 结论与讨论

在以前的研究中，针对 RAPD 技术存在稳定性低的缺点，主要是从镁离子浓度、模板浓度、PCR 循环^[16]条件等方面对体系进行优化。部分研究了引物浓度的影响了。本研究通过引物碱基数量的增加和退火温度的筛选来优化 RAPD 体系，建立一套稳定性好、扩增性强的体系。一般情况下，引物越短，模板序列两端与引物互补的位点数量越多，也会引起模板互补配对稳定性低的问题。根据引物长度对 RAPD 扩增效果影响的研究，在很多果树树种上 11 个碱基的引物要比 9 和 10 个碱基的引物的扩增效果好，本研究筛选了榧树属的 11 个碱基的随机引物用于 PCR 扩增。其次，在 35 ~ 45℃ 设置温度梯度进行退火温度筛选，将重复性好、条带一致的温度作为退火温度。综上两点，碱基数量和退火温度的选择优化了 RAPD 反应体系，在很大程度上克服了 RAPD 技术稳定性差的缺点，提高了品种鉴定的可靠性。

MCID 法虽然在葡萄、枇杷等果树上进行应用，有效的区分了大量品种，但在榧树属上还是首次通过优化 RAPD 反应体系，利用 5 条引物将 19 个种的标记信息转化为实用性的有效信息。之前很多学者对于榧树品种的鉴定只是针对少数主栽品种，而且使用的引物数量也较多，在引物的碱基数量上大多采用 9~10 个碱基的引物。

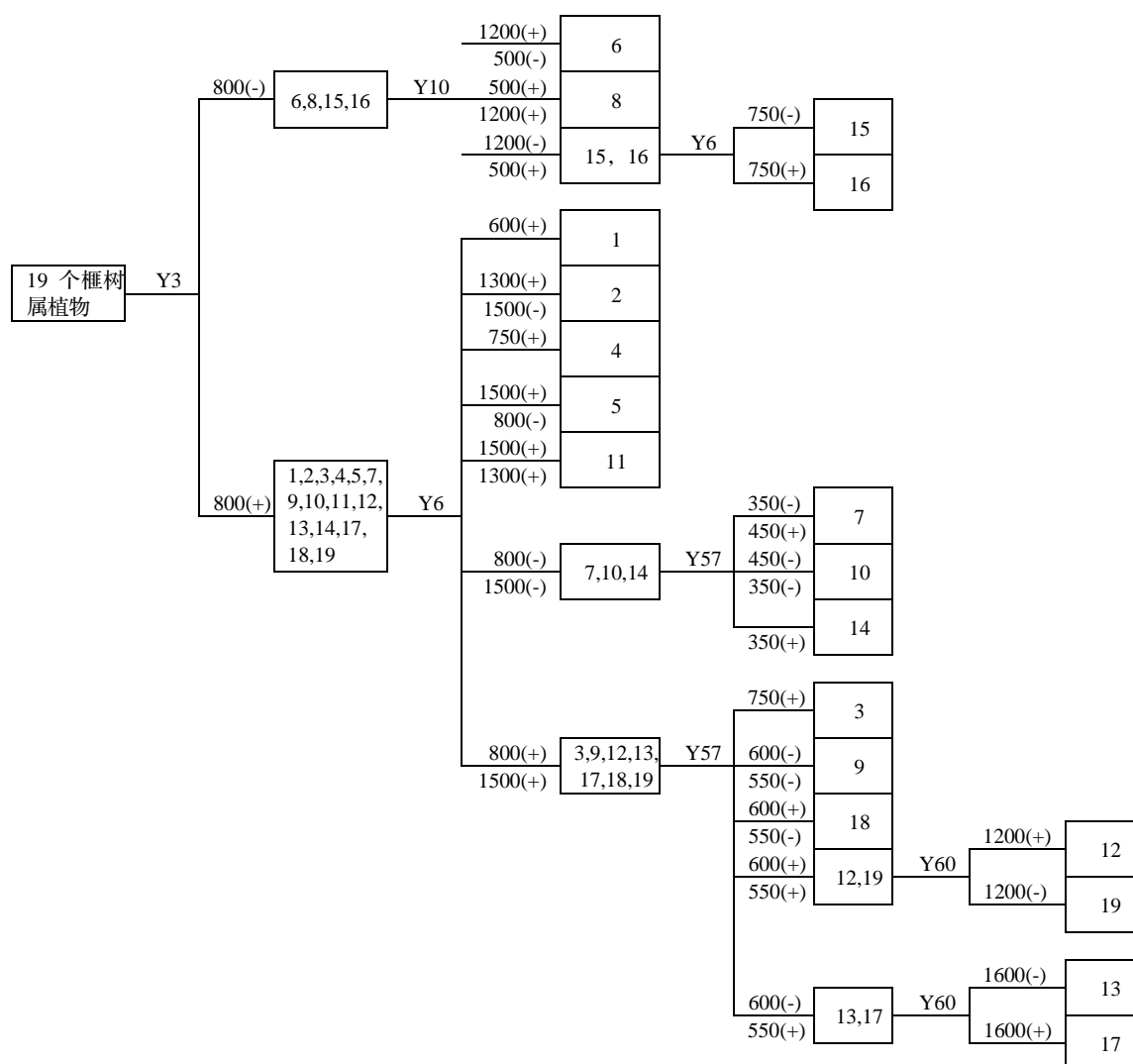


图3 5个引物区分19个榲桲属植物的图谱关系示意图

Figure 3 Relationship of schematic map for identifying tested plants by 5 random primers

MCID 法只需要很少的引物就可以将品种区分开来,大大提高了引物的利用效率,同时该方法对实际生产也起了重要的指导作用。该方法还可以用在其他树种的大量品种的鉴定上,是行之有效的方法,可以真正服务于榲桲属植物的种苗企业、种质资源管理、品种产权保护等各个方面。

参考文献:

- [1] Moreno S, Gogorcena Y, Ortiz J M. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci Hor*, 1995, 62 (4): 237-243.
- [2] Mariniello L, Sommella M G, Sorrentino A, *et al*. Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 749-755.
- [3] Demirsoy L, Demir T, Demirsoy H, *et al*. Identification of some sweet cherry cultivars grown in Amasya by RAPD markers. *Acta Hor*. 2008 (795): 147-153.
- [4] 谭晓风, 胡芳名, 张党权, 等. 香榲桲主要栽培品种的 RAPD 分析[J]. *园艺学报*, 2002, 29 (1): 69-71.
- [5] 张党权. 香榲桲主要栽培品种的 RAPD 分子鉴别[D]. 中南林学院, 2001.
- [6] 戴正, 陈力耕, 童品璋. 香榲桲品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析[J]. *园艺学报*, 2008, 35 (8): 1 125-1 130.

- [7] 李红. 利用 RAPD 技术筛选香榧分子作图群体及其品种类群的划分[D]. 长沙: 中南林学院, 1999.
- [8] Wang Y J, Li X Y, Han J, *et al.* Analysis of genetic relationships and identification of flowering-mei cultivars using EST-SSR markers developed from apricot and fruiting-mei. *Sci Hor.* 2011, 132 (1) : 12-17.
- [9] Zhang X Y, Qian J L, Wang H K, *et al.* A novel strategy employed in identification of 25 important loquat cultivars using RAPD marker. *Caryologia.* 2011, 64 (3) : 265-271.
- [10] 张晓莹, 张彦, 宋长年, 等. 利用基于 DNA 标记的人工绘制植物品种鉴别图 (MCID) 法快速鉴定欧亚葡萄品种[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20 (6) : 703-714.
- [11] 王玉娟, 张彦, 房经贵, 等. 利用基于 RAPD 标记的 MCID 法快速鉴定 72 个葡萄品种[J]. 中国农业科学, 2012, 45 (14) : 2913-2922.
- [12] 王晨, 房经贵, 章镇, 等. 浅谈中国果树品种权益保护及其现状[J]. 中国农学通报, 2009 (24) : 298-302.
- [13] 胡文翠, 申响保, 谭晓风, 等. 香榧不同部位 DNA 提取效果研究[J]. 湖南林业科技, 2006, 33 (6) : 17-19.
- [14] 房经贵, 刘大钧, 马正强. 利用双杂合位点标记资料构建芒果遗传图谱[J]. 分子植物育种, 2003, 1 (3) : 313-319.
- [15] 于华平, 房经贵, 张美勇, 等. RAPD 标记用于葡萄、苹果等七种果树的品种鉴定的研究. 江西农业学报, 2009, 21 (10) : 5-9.
- [16] 胡芳名, 张党权, 乌云塔娜. 香榧 RAPD 分析试验条件的优化[J]. 经济林研究, 2002, 20 (3) : 5-7.