

几个槐树植物的 ISSR 鉴定^①

冷言峰, 马云芳, 何桥, 郭启高, 梁国鲁

西南大学 园艺园林学院果树学重点实验室, 重庆 400716

摘要: 运用 ISSR 分析技术, 对香花槐、龙爪槐、刺槐和红花槐 4 份材料进行品种鉴定和聚类分析. 用筛选出的 19 个引物扩增得到了 4 个槐树植物的 DNA 指纹图谱, 结果表明各槐树之间的相似性系数在 0.18~0.91 之间, 龙爪槐和红花槐间的相似性系数为 0.18, 香花槐和红花槐间的相似性系数为 0.91, 香花槐、龙爪槐、刺槐和红花槐在 DNA 分子水平上的差异较明显, 据此我们初步认为香花槐和红花槐不存在同物异名现象.

关键词: 槐树; ISSR; 品种鉴定; 聚类分析

中图分类号: S792.26; Q-332

文献标识码: A

槐树为豆科蝶形花亚科落叶乔木, 其树势强健, 生长迅速, 是集用材、观赏、药用、饲料等用途于一体的优良树种. 香花槐(*Cladrastis sinensis* Hemsl) 又称富贵树, 原产西班牙, 1996 年由朝鲜引入我国, 2001 年被定为我国大力发展美化、绿化高档优良新品种, 并在全国范围内大量推广^[1-2]. 红花槐(*Robinia pseudoacacia* 'decaisneana') 为豆科刺槐属的一个变种, 是由韩国引进的饲料槐新品种, 随着我国畜牧业结构的调整, 加快开发高产饲料红花槐将是实现畜牧业可持续发展的最佳生产和技术途径^[3].

香花槐和红花槐有很多相似之处, 特别是早期很难通过形态学观察加以区分, 而分子标记作为一种新型有效的遗传标记, 它不受时空的限制, 广泛应用于生物遗传多样性和亲缘关系分析、指纹图谱构建、分子标记辅助育种等多个方面, 并在苗木的早期鉴定中发挥出了重要的作用. ISSR (Inter-simple Sequence Repeat) 是一种基于微卫星序列发展起来的分子标记, 具有简便、多态性高, 稳定性和重复性好等优点, 目前已广泛应用于种质资源鉴定、遗传图谱构建等多个方面^[4-5].

本实验室在引进槐树种植推广过程中, 初步的生物学观察和同工酶分析认为香花槐和红花槐可能是同一品种^[6], 即常见的“同物异名”现象. 为此, 本实验针对这一质疑, 构建了香花槐、刺槐、龙爪槐及红花槐 4 个槐树品种的 ISSR 指纹图谱, 以达到早期分子鉴定的目的.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用材料全部取自西南大学校园内, 试材编号为: ①香花槐(*Cladrastis sinensis* Hemsl), ②龙爪槐(*Sophora japonica* var. *pendula* Loud), ③刺槐(*Robinia pseudoacacia* Linn), ④红花槐(*Robinia pseudoacacia* 'decaisneana'). 采集各份材料幼嫩的植物叶片, 洗净后-20℃短期保存备用.

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[7-8], 并有所改进. 称取幼嫩叶片约 1 g 加入适量 PVP 而未加

① 收稿日期: 2007-04-20

作者简介: 冷言峰(1980-), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事果树生物技术研究.

通讯作者: 梁国鲁, 教授, 博士生导师.

维生素 C, 用 2% 的 CTAB 提取液裂解 45 min. 并且在纯化过程中的第 1 次抽提采用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 以进一步去除蛋白质.

1.2.2 ISSR 扩增

ISSR 扩增体系为: $1 \times$ PCR buffer、0.25 mmol/L dNTP、2.0 mmol/L $MgCl_2$ 、1.25 U Taq DNA 聚合酶、0.32 μ mol/L 引物和 1 ng/ μ L 基因组 DNA, 加灭菌双蒸水至 20 μ L, PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 50~52 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min. 该扩增反应在 DNA 扩增仪(Eppendorf 公司产品)进行.

PCR 反应结束, 向 PCR 管中加 3 μ L 上样缓冲液, 混匀后取 13 μ L 点样, 200V 电压下, 1.5% 琼脂糖电泳至溴酚蓝距胶前沿约 2 cm 处, 结束电泳. 所用电泳仪和电泳槽为北京六一公司生产.

EB 染色约 20 min 后在紫外灯箱下用数码相机照相.

1.2.3 数据统计及分析方法

统计标记资料时, 为确保准确性与可靠性, 选取清晰可辨的扩增条带用于数据统计分析. 强反应带记“1”, 弱反应带重复出现记“1”, 弱反应带出现但不重复记“0”, 无带记“0”, 计算其扩增带总数和特异带总数, 并将 0, 1 矩阵图(*.TXT 格式)输入计算机. 数据采用 NTSYSpC-2.02a 软件处理, 相似性系数采用 Dice 系数, UPGMA 聚类分析得到 4 份材料的聚类关系图. 相似性系数计算公式为: $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 S_{ij} 为材料 i 和 j 的相似系数, N_{ij} 是材料 i 和 j 共有的条带数, N_i 和 N_j 分别是 i 和 j 各自的条带数^[9].

2 结果与分析

2.1 扩增产物的多态性

从 50 条 ISSR 引物中筛选出 19 条扩增条带清晰、稳定性好的引物(见表 1). ISSR 引物共扩增出 224 条带纹, 其中多态性条带 214 条, 多态位点百分率为 95.5%. 19 条引物中扩增条带数最少 5 条, 最多 20 条, 多态性位点百分率在 87.5% 以上.

表 1 ISSR 扩增结果统计表

引物	序列	扩增条带数	多态性条带数	多态位点百分数/%
807	(AG) ₈ T	19	19	100
808	(AG) ₈ C	17	17	100
809	(AG) ₈ G	20	19	95
810	(GA) ₈ T	15	15	100
813	(CT) ₈ T	7	7	100
814	(CT) ₈ A	7	7	100
815	(CT) ₈ G	7	7	100
822	(TC) ₈ A	6	6	100
823	(TC) ₈ C	5	5	100
824	(TC) ₈ G	9	9	100
825	(AC) ₈ T	8	7	87.5
826	(AC) ₈ C	13	13	100
827	(AC) ₈ G	5	4	80
834	(AG) ₈ YT	10	7	70
835	(AG) ₈ YC	15	15	100
836	(AG) ₈ YA	16	15	93.8
840	(GA) ₈ YT	13	13	100
841	(GA) ₈ YC	16	15	93.8
842	(GA) ₈ YG	16	14	87.5
总和		224	214	

备注: Y = (C, T).

2.2 品种鉴定

利用筛选得到的 19 条 ISSR 引物分别对供试材料进行 PCR 扩增, 并建立了相应的 DNA 指纹图谱(见图 1). 在 19 条引物中有 3 条引物 807、809 和 826 扩增得到的指纹图谱能够分别区分开 4 个槐树品种, 根据指纹图谱, 将迁移率相同的带作为同源带, 以“+”和“-”记录特异条带的有无, 建立分子指纹(见表 2). 其中有些品种都有其区别于其他品种的特异带, 如龙爪槐, 有特异的 807-2200, 807-1400, 807-600, 809-1600, 809-500 和 826-500 带; 刺槐有特异的 807-950, 807-1700, 809-1150 和 826-1200 带; 红花槐有特异的 809-1500, 809-1300 和 826-1150 带.

同时, 对于从形态上难以辨别的红花槐和香花槐, 在本实验中仅用 1 个引物就可以将它们区分开(见表 2).

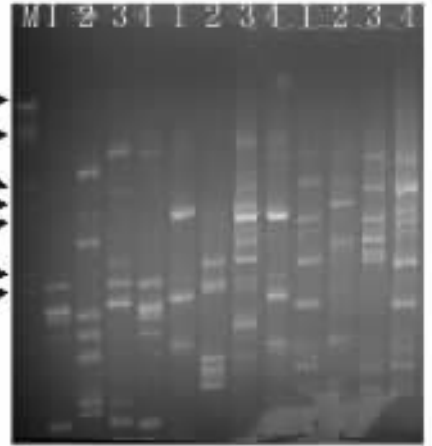


图 1 引物 807 和 808 及 809 的 ISSR 指纹图谱

表 2 4 个品种的特异性指纹

条带大小/bp	品种				条带大小/ bp	品种				条带大小/ bp	品种			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
807-2 600			+	+	809-2 200	+		+	+	826-2 200	+		+	+
807-2 200		+			809-1 700	+	+	+	+	826-1 600	+			+
807-1 700			+		809-1 600		+			826-1 200			+	
807-1 400		+			809-1 500				+	826-1 150				+
807-950			+		809-1 400	+		+	+	826-1 050	+	+		+
807-600	+		+	+	809-1 300				+	826-1 000	+		+	+
807-580	+	+		+	809-1 200		+	+		826-800	+	+		+
807-320		+	+		809-1 150			+		826-700	+		+	+
807-300		+			809-1 100	+		+	+	826-500		+		
807-270	+		+	+	809-800	+			+					
					809-500			+						
					809-320	+		+	+					

2.3 聚类分析

表 3 4 个槐树品种的相似性系数表

	香花槐	龙爪槐	刺槐	红花槐
香花槐	1.000 000 0			
龙爪槐	0.195 122 0	1.000 000 0		
刺槐	0.589 285 7	0.253 521 1	1.000 000 0	
红花槐	0.913 242 0	0.182 692 3	0.607 929 5	1.000 000 0

从表 3 可以看出, 各槐树品种材料之间的相似性系数在 0.18~0.91 之间, 最小的是龙爪槐与红花槐间的相似性系数(0.18), 相似性系数最高的是香花槐与红花槐, 相似性系数为 0.91. 聚类结果表明, 香花槐与红花槐间的遗传相似性最高, 它们与刺槐的相似程度较低, 而以上三者与龙爪槐的亲缘关系最远(图 2). 这与刺槐和龙爪槐的生物学性状跟香花槐和红花槐相差较大的观察结果相吻合.

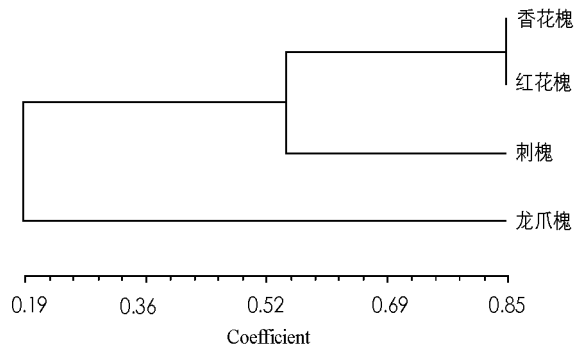


图 2 4 个槐树品种的 ISSR 聚类结果图

3 讨 论

ISSR-PCR 有一套通用引物, 其实验操作简单、快捷, 在品种资源研究中有较大的应用潜力^[10]. 该方法可为保护槐树育种产权、登录新品种, 以及鉴定和检

测品种的真实性和纯度仲裁品种纠纷等提供客观、科学的技术依据^[11]。我们的研究发现香花槐、龙爪槐、刺槐和红花槐在 DNA 分子水平上有较明显差异。香花槐和红花槐在形态上有很大的相似性,难以区别真伪,在本实验中它们的相似性系数最大,亲缘关系最近,但仍存在一定的遗传变异,而且仅用一个引物就可将这两个品种区分开,由此初步认为香花槐和红花槐并非同物异名,即它们不是同一个品种。

本实验利用 ISSR 技术鉴定香花槐和红花槐是否出现同物异名现象得出的初步结果与用同工酶分析的结果不一致。EST 和 POD 同工酶分析表明红花槐和香花槐的两种酶谱一致,应是同一品种的不同类型。这是由于 2 种检测技术的差异引起的,ISSR 技术以测定微卫星标记为目标,检测的位点数目较多,而同工酶测定的是蛋白质,而且检测使用的同工酶种类较少。

参考文献:

- [1] 张文华, 西班牙速生香花槐 [J]. 河南农业. 2003, (3): 12.
- [2] 梁忠纪, 园林珍稀树种: 西班牙香花槐 [J]. 农业新技术, 2002, (11): 31.
- [3] 周玉晓, 高产优质饲料——红花槐 [N]. 齐鲁牧业报, 2005, 8.
- [4] 张青林, 罗正荣, ISSR 及其在果树上的应用 [J]. 果树学报, 2004, 21 (1): 54—58.
- [5] Smith J S C, Register III J C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective [J]. Seed Science Research, 1998, 8 (2): 285—293.
- [6] 李晓林, 柴巧. 园林植物槐树的同工酶分析 [J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(6): 950—952.
- [7] 刘月学, 杨向辉, 林顺权, 等. 枇杷属植物基因组 DNA 提取方法的改进及其应用 [J]. 果树学报 2005, 22(2): 182—185.
- [8] VOS P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acid Res, 1995, 23 (21): 4407—4414.
- [9] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theoretical and Applied Genetics. 2000, 100: 1311—1320.
- [10] 邱英雄, 傅承新, 孔航辉. 杨梅不同品种的 ISSR 分析 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10 (4): 343—346.
- [11] 姚明哲, 黄海涛, 余继忠, 等. ISSR 在茶树品种分子鉴别和亲缘关系研究中的适应性分析 [J]. 茶叶科学, 2005, 25 (2): 153—157.

ISSR-Based Identification of Several Pagodatree Plants

LENG Yan-feng, MA Yun-fang,
HE Qiao, GUO Qi-gao, LIANG Guo-lu

Horticulture and Landscape College, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Identification and cluster analysis of four pagodatree plants: *Cladrastis sinensis* Hemsl, *Sophora japonica* var. *pendula* Loud, *Robinia pseudoacacia* Linn. and *Robinia pseudoacacia* ‘*decaisneana*’ were carried with ISSR marker. The DNA fingerprints of 4 pagodatree plants were obtained with the PCR amplification primed by 19 primers. The results showed that the similarity coefficient of them ranged from 0.18 to 0.91. The similarity coefficient between *Sophora japonica* var. *pendula* Loud and *Cladrastis sinensis* Hemsl is 0.18. and that between *Robinia pseudoacacia* ‘*decaisneana*’ and *Cladrastis sinensis* Hemsl is 0.91. The four materials have obvious difference on the DNA level. A primary conclusion can be obtained that there is no synonym among *Robinia pseudoacacia* ‘*decaisneana*’ and *Cladrastis sinensis* Hemsl.

Key words: pagodatree; ISSR; cultivars identification; cluster analysis