

## 进口黄檀属木材 DNA 提取与分子鉴定方法初步研究

伏建国<sup>1</sup>, 刘金良<sup>2</sup>, 杨晓军<sup>1</sup>, 安榆林<sup>1</sup>, 骆嘉言<sup>2</sup>

(1. 江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001; 2. 南京林业大学 木材工业学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 由于黄檀属 *Dalbergia* 种类较多, 很多种类通过形态学方法难以区分, 给中国进口木材检验鉴定工作带来了很大困难。为了研究黄檀属木材的分子鉴定方法, 选取进口木材中常见的 7 种黄檀属木材, 通过比较不同的木材 DNA 提取和纯化方法, 摸索出了适合于黄檀属木材的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)十二烷基硫酸钠(SDS)磁珠相结合的 DNA 提取和纯化体系, 利用巢式聚合酶链式反应(PCR)扩增出 433 bp 的 *matK* 基因片段, 共发现 12 个碱基位点差异, 可以将 7 种进口黄檀属木材及我国的降香黄檀 *Dalbergia odorifera* 逐一区分开, 为黄檀属木材分子识别鉴定研究工作奠定了良好的基础。图 2 表 1 参 23

**关键词:** 林业工程; 黄檀属木材; DNA 提取; 纯化; 巢式 PCR; *matK* 基因; 鉴定

中图分类号: S781.1; Q341 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2013)04-0627-06

## DNA extraction and molecular identification of imported *Dalbergia* wood

FU Jianguo<sup>1</sup>, LIU Jinliang<sup>2</sup>, YANG Xiaojun<sup>1</sup>, AN Yulin<sup>1</sup>, LUO Jiayan<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, The People's Republic of China, Nanjing 210001, Jiangsu, China; 2. College of Wood Science and Technology, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** Establishing a reliable and cost effective method to identify and distinguish wood is important in preventing the illegal timber trade. To overcome the difficulty of distinguishing *Dalbergia*, which consists of many valuable species, by morphological methods, molecular genetic tools to control species identity were studied. Seven species of *Dalbergia* wood, *D. melanaoxylon*, *D. oliveri*, *D. retusa*, *D. louvelii*, *D. greveana*, *D. cochinchinensis*, *D. cultrate*, imported from different countries and one domestic species *D. odorifera* were selected for testing. Next, an array of different wood DNA extraction and purification methods, including DNeasy Plant Mini Kit, hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS) and Magnetic Beads based method, were tried; For the amplification of DNA from wood samples, two PCR reactions were successively performed (nested PCR) and allowed the amplification of one coding region of chloroplast DNA (cpDNA). Results showed that a CTAB-SDS-Magnetic Beads based method was available for *Dalbergia* wood DNA extraction. Then, 433 bp *matK* gene fragments were amplified and sequenced from the seven species, of which a total of 12 single nucleotide polymorphisms were found. These polymorphic sites were able to distinguish the eight *Dalbergia* species. Thus, establishment of this method for DNA isolation and polymerase chain reaction (PCR) amplification makes *Dalbergia* wood amenable to DNA-based identification. [Ch, 2 fig. 1 tab. 23 ref.]

**Key words:** forest engineering; *Dalbergia* timber; DNA extraction; purification; nested-polymerase chain reaction (PCR); *matK*; identification

收稿日期: 2012-04-27; 修回日期: 2012-06-13

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2008IK237); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAK11B03)

作者简介: 伏建国, 农艺师, 博士研究生, 从事出入境植物检疫及物种资源查验工作。E-mail: fujg@jsci.gov.cn。通信作者, 安榆林, 研究员, 从事出入境植物检疫工作。E-mail: anyl@jsci.gov.cn

木材识别技术对于木材的合理使用和生产加工,打击非法采伐,保护珍稀濒危材种,规范市场秩序,维护消费者权益等方面具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。传统的形态解剖学鉴定方法通常无法准确将木材鉴定到种的水平,而且要求鉴定者具有丰富的木材形态解剖学知识及鉴定经验。近年来,随着分子遗传学的发展,分子标记及DNA条形码技术<sup>[3-7]</sup>逐渐成为物种辅助鉴定的工具。一些研究者开始尝试利用这些分子生物学方法进行木材树种鉴定<sup>[2]</sup>。由于木材DNA含量低、降解严重、含有抑制聚合酶链式反应(PCR)扩增物质等多方面的原因<sup>[8]</sup>,高质量木材DNA的提取一直是一个很难突破的技术瓶颈,从而阻碍了分子遗传学在木材识别中的应用。自1998年Filippis<sup>[9]</sup>等利用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法成功提取刺槐*Robinia pseudoacacia*木材DNA以来,后继学者采用改良的CTAB或商业试剂盒(多采用DNeasy Plant Mini Kit)先后从栎属*Quercus* spp.<sup>[10-11]</sup>,松木*Pinus* spp.<sup>[12]</sup>,棱柱木*Gonystylus bancanus*<sup>[13]</sup>,龙脑香科Dipterocarpaceae<sup>[14]</sup>等多种木材中提取出可满足不同片段长度PCR扩增的DNA,利用分子标记技术实现了几种木材材种的鉴定<sup>[14-17]</sup>,证明了分子遗传学技术在材种识别领域应用的可行性。近年来,为了满足国内日益增长的木材消费需求,中国每年进口大量珍贵木材,黄檀属*Dalbergia*是其中最为珍贵的种类之一。中华人民共和国国家标准GB/T 18107-2000《红木》<sup>[18]</sup>中确认了33个红木树种,黄檀属树种就占了16种。黄檀属木材种类较多,形态学方法通常难以准确识别鉴定,建立分子生物学鉴定方法对于进口木材检验鉴定意义重大。目前,还未见关于黄檀属木材DNA提取及分子鉴定的研究。本研究拟通过比较不同的DNA提取及纯化方法,建立适合黄檀属木材DNA提取的方法体系,对进口黄檀属木材进行初步的分子鉴定试验,为黄檀属木材分子鉴定研究工作打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

7种黄檀属样品取自张家港口岸进口的木材,经过南京林业大学鉴定;降香黄檀叶片采自中国云南西双版纳植物园(表1)。

表1 实验用材料信息

Table 1 Test materials' information

| 编号 | 材种                                    | 来源    | 取材部位  | 重复 |
|----|---------------------------------------|-------|-------|----|
| D  | 东非黑黄檀 <i>Dalbergia melanoxylon</i>    | 莫桑比克  | 边材及心材 | 3  |
| A  | 奥氏黄檀 <i>Dalbergia oliveri</i>         | 缅甸    | 心材    | 3  |
| W  | 微凹黄檀 <i>Dalbergia retusa</i>          | 南美    | 心材    | 3  |
| L  | 卢氏黑黄檀 <i>Dalbergia lowelii</i>        | 印度尼西亚 | 心材    | 3  |
| m  | 马达加斯加黄檀 <i>Dalbergia greveana</i>     | 马达加斯加 | 心材    | 3  |
| J  | 交趾黄檀 <i>Dalbergia cochinchinensis</i> | 老挝    | 心材    | 3  |
| Z  | 刀状黑黄檀 <i>Dalbergia cultrate</i>       | 缅甸    | 心材    | 3  |
| P  | 降香黄檀 <i>Dalbergia odorifera</i>       | 中国云南  | 叶片    | 3  |

### 1.2 DNA提取

1.2.1 试剂盒法 采用Qiagen的DNeasy Plant Mini Kit试剂盒法提取,用手术刀削取150.0 mg木材削片,加入液氮,用低温破碎仪(Retsch MM400)研磨4 min,频率30次·s<sup>-1</sup>,迅速将粉末移入2.0 mL离心管中,加入800 μL AP1缓冲液,颠倒混匀,在65℃水浴锅中水浴过夜,余下操作步骤根据试剂盒操作说明进行。

1.2.2 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)十二烷基硫酸钠(SDS)提取法 用手术刀削取约1.0 g木材削片,加入液氮,在低温破碎仪(Retsch MM400)上研磨4 min,频率30次·s<sup>-1</sup>,立即将粉末移入50.0 mL离心管中,加入10.0 mL 20.0 g·kg<sup>-1</sup> CTAB溶液,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)0.2 g,200.0 μL 巯基乙醇,20.0 μL 蛋白酶K(20.0 g·L<sup>-1</sup>),混匀后加入350.0 μL 200.0 g·kg<sup>-1</sup> 十二烷基磺酸钠(SDS),再次充分混匀,65℃水浴过夜,余下步骤参考Novaes<sup>[19]</sup>等从豆科Leguminosae树皮中提取DNA的方法,在其基础上略有改变。

### 1.3 DNA 纯化

1.3.1 柱吸附纯化 采用 Promega 的 DNA 纯化试剂盒 Wizard DNA Clean-up System, 详细操作步骤如下: 在 1.5 mL 离心管中加入 1.0 mL Wizard DNA Clean-up Resin, 加入提取后的 DNA 溶解液 150.0  $\mu\text{L}$ , 颠倒均匀后利用注射筒推入微型柱中; 吸取 2.0 mL 800.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  异丙醇溶液缓慢推入到微型柱中; 移走注射筒, 将微型柱放入 1.5 mL 离心管上, 最大转数离心 2.0 min; 将微型柱移到新的离心管上, 加入 50.0  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液到微型柱上, 放置 1.0 min, 最大转数离心 20 s; 收集纯化后 DNA 溶液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存。

1.3.2 磁珠法纯化 采用 GenMagBio 公司的植物 DNA 磁珠纯化试剂盒, 详细操作步骤如下: 取 150  $\mu\text{L}$  DNA 溶液于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积无水乙醇和 20.0  $\mu\text{L}$  磁珠, 颠倒混匀 10 min; 将离心管置于磁力架 1.0 min, 用移液器移走管内液体; 加入 500.0  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液(wash buffer I), 颠倒混匀数次, 利用磁力架吸附磁珠, 1.0 min 后移走管内液体; 再次加入 500.0  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液(wash buffer I), 混匀, 磁力架吸附, 1.0 min 后移走管内液体, 同时保持离心管置于磁力架上, 使磁珠继续被吸附; 从离心管另一侧缓慢加入 550.0  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液(wash buffer II), 1.0 min 后移走管内液体, 取下离心管; 加入 50.0  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液(elution buffer), 使磁珠重新悬浮,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  温浴 10.0 min, 其间轻轻晃动使核酸充分洗脱; 将离心管置于磁力架上 1.0 min, 使磁珠被吸附, 将液体转移至新的 1.5 mL 离心管, 即为纯化后的 DNA 溶液。

### 1.4 巢式 PCR 引物设计与扩增

本实验根据 Genbank 上发表的黄檀属叶绿体基因 *maturase K (matK)* 片断设计 2 轮巢式 PCR 引物, 第 1 轮正反向引物分别为 *matK-F1* AGAAGAGTCGGAAATCAT 和 *matK-R1* TGAATTCTCGGATAATAA, 目标片断约为 600 bp; 第 2 轮正反向引物分别为 *matK-F2* GTCTTCGATACTGGGTGAA 和 *matK-R2* GATCGTTCCAGGTTGAGA, 目标片断约为 470 bp; PCR 扩增采用 Takara 公司的 Premix Ex Tag 混合酶液, 50.0  $\mu\text{L}$  反应体系, Premix Ex Tag 混合酶液 25.0  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 正反向引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)21.0  $\mu\text{L}$ 。第 1 轮扩增反应程序:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5.0 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$  1.0 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1.0 min, 循环 30 次,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10.0 min。第 1 轮扩增产物用双蒸水稀释 50 倍后作为第 2 轮扩增的模板。第 2 轮扩增系统与第 1 轮相同, 反应程序:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5.0 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $49\text{ }^{\circ}\text{C}$  1.0 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1.0 min, 循环 36 次,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10.0 min。

### 1.5 PCR 产物检测与测序

PCR 扩增产物通过 15.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的琼脂糖凝胶电泳检测, 加入 8.0  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 150 V 电泳 30.0 min, 溴化乙锭中染色 30.0 min, 放入凝胶成像系统中观察、拍照。扩增出清晰条带的 PCR 产物送上海生工测序, 测序引物采用 PCR 扩增引物, 所有序列均进行双向测序。对测序结果首先进行手工判读和校对, 然后用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 拼接。

## 2 结果与分析

### 2.1 2 种提取方法的比较

本实验分别用 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒和 CTAB-SDS 法对 7 种黄檀属木材进行了 DNA 提取, 提取的 DNA 未经纯化直接进行浓度检测, 2 种检测方法获得的 DNA 产量均较低。利用试剂盒提取, 平均 1.0 g 木材可获得 DNA 5.3  $\mu\text{g}$ , DNA 质量也较差,  $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$  为 1.012~1.460。利用 CTAB-SDS 提取法, 平均 1.0 g 木材可获得 DNA 7.9  $\mu\text{g}$ ,  $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$  为 1.150~1.557。以试剂盒法及 CTAB-SDS 法提取但均未做纯化处理的 DNA 为模板, 采用巢式 PCR 引物进行扩增, 均没有扩增出目标条带, 说明 2 种提取方法获得 DNA 的质量均不高, 含有大量杂质, 影响 PCR 扩增。

### 2.2 2 种纯化方法的比较

选取 CTAB-SDS 法提取的 DNA 原液为材料, 分别使用 Wizard DNA Clean-up System 纯化法和磁珠纯化法进行纯化, 前者纯化后  $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$  为 1.214~1.650, 后者纯化后  $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$  为 1.410~1.770, 但 2 种纯化方法获得的 DNA 浓度均下降 10 倍左右。以 2 种方法纯化后获得的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 用 Wizard DNA Clean-up System 方法纯化后, 降香黄檀、东非黑黄檀、交趾黄檀和马达加斯加黄檀可扩增出清晰单一明亮的目标条带, 但奥氏黄檀、刀状黑黄檀、微凹黄檀及卢氏黑黄檀仍未扩增出目标条带; 而用磁珠法纯化后, 8 种实验材料均扩增出清晰明亮单一的目标条带(图 1)。



### 2.3 PCR 扩增与测序结果

用 CTAB-SDS 方法和磁珠法对表 1 中的 24 份样品进行 DNA 提取和纯化, 获得的纯化产物经过巢式 PCR 扩增, 所有样品均扩增出目标条带。PCR 扩增产物直接送测序公司进行测序, 测序结果在 Genbank 上进行比对, 与已经发表的黄檀属 *matK* 基因片段具有 99% 的相似度, 证明本实验提取的 DNA 确是黄檀属木材的 DNA。8 种黄檀属树种序列比对结果如图 2 所示, 测序获得的 *matK* 基因片段长度为 433 bp, 8 个种存在 12 处碱基位点差异, 可将这 8 种黄檀属树种区分开来。在基因位点 54 和 399 处, 可将卢氏黑黄檀与其余种区分开; 在基因位点 154 和 250 处, 可将微凹黄檀与其余种区分开; 在基因位点 175 和 425 处, 可将交趾黄檀与其余种区分开; 在基因位点 263 处, 可将东非黑黄檀与其余种区分开; 在基因位点 296 处, 可将马达加斯加黄檀与其余种区分开; 在基因位点 297 处, 可将刀状黑黄檀与其余种区分开; 在基因位点 147 和 175 处, 可将降香黄檀与其余种区分开; 在基因位点 85, 296 和 399 处, 可将奥氏黄檀与其余种区分开。

### 3 结论与讨论

由于木材的物理性质和化学成分在不同树种间存在较大差异, 针对不同木材 DNA 提取, 可能需要不同的提取和纯化方法。目前, 一些商业试剂盒在龙脑香科 Dipterocarpaceae 和栎属 *Quercus* 等一些树种的木材 DNA 提取上取得了成功<sup>[8]</sup>, 如 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒方法在一些木材的提取中获得了成功<sup>[10,20-21]</sup>, 但本实验在黄檀属木材的 DNA 提取中未能获得成功, 失败的原因可能有 2 个方面: 一是本实验所用的黄檀属木材均为心材部分, 砍伐前细胞已经死亡多年, DNA 降解严重, 150.0 mg 干木材中所含的 DNA 总量不多, 导致获得的 DNA 量极低; 二是 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒主要是针对少量新鲜样品设计的, 所用各种提取液很少, 黄檀属木屑容易吸水, 导致提取液不能充分与样品混匀, DNA 抽提不彻底, 很多抑制 PCR 扩增的物质也难以充分去除。相比之下, CTAB-SDS 法所用的样品量和试剂量都较多, 抽提比较充分, 所以提取的效果好过试剂盒法。

本研究针对黄檀属木材材质坚硬(难以破碎)、心材形成年限较长(DNA 降解严重)、颜色较深(色素等杂质影响 PCR 扩增)等困难, 通过比较不同提取和纯化方法, 摸索出了 CTAB-SDS-磁珠相结合的 DNA 提取和纯化体系, 从以下几个方面改进了木材 DNA 提取方法: 在研磨器中加入液氮, 边冷冻边研磨, 一定程度上减少了 DNA 降解的发生; 重复液氮冷冻研磨可以使样品足够细, DNA 释放更彻底; PVP, 蛋白酶 K 的加入, 能够去除样品中抑制 PCR 扩增的物质<sup>[22]</sup>; 磁珠法通过核酸特异性吸附进行纯化, 进一步保证了 DNA 的质量。即便如此, 部分木材 DNA 提取液仍然不能满足普通的一轮 PCR 扩增, 需要通过巢式 PCR 扩增。推测是因为部分样品降解严重, DNA 绝对含量低, 经过提取和纯化后, 目标片段的含量更低, 导致一轮 PCR 无法检测到目标条带。

一些实验证明, 树木边材中可能含有部分活细胞, 心材中已基本没有活细胞<sup>[23]</sup>, 因此从边材中提取 DNA 的质量要高<sup>[22]</sup>, 本研究也证实了这一结论。从东非黑黄檀边材中获取 DNA 的量是心材中的 16 倍, 边材 DNA 提取液颜色较浅, 而心材 DNA 提取液为褐色, 最后获取的 DNA 沉淀也为褐色。边材 DNA 的平均  $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$  为 1.602, 而心材 DNA 的平均  $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$  为 1.280。巢式 PCR 扩增结果显示, 边材 DNA 2 轮均扩增出清晰的目标条带, 而心材 DNA 第 1 轮未扩增出条带, 第 2 轮扩增出清晰条带。这一结论也为后续研究进口黄檀属木材的取样工作提供了依据。

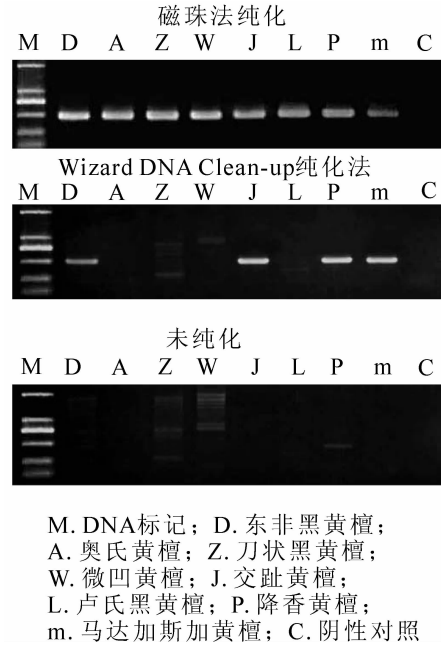


图 1 不同纯化方法获得的 8 种黄檀属 DNA PCR 扩增结果

Figure 1 PCR application result after DNA purification by different methods of eight different *Dalbergia* species

|                           |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| Dalbergia melanoxyylon    | GAAAGATCCC | CCCTTCTTTC | ATTTATTAAG | ATTGTTTATT | TATGAGTATT | GTAATTGGAA | TAGTCTTATT | ACTAAAAAAA | :80  |
| Dalbergia cochinchinensis |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia louvelii        |            |            |            |            |            | G          |            |            |      |
| Dalbergia greveana        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia retusa          |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia cultrate        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia odorifera       |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia oliveri         |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia melanoxyylon    | AACCTTATTC | TACTTTTTCA | AAAAGTAATC | CAAGAATTCT | CTTGTTCCTA | TATAATTTT  | ATGTATGTGA | ACACGAATCC | :160 |
| Dalbergia cochinchinensis |            |            |            |            |            |            | A          |            |      |
| Dalbergia louvelii        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia greveana        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia retusa          |            |            |            |            |            |            |            | T          |      |
| Dalbergia cultrate        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia odorifera       |            |            |            |            |            |            |            | A          |      |
| Dalbergia oliveri         |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia melanoxyylon    | ATCTTCCTTT | TTCTACGTAA | GAGATCCTCT | TATTTACGAT | TAAACTCTTT | TATCGTTATT | TTTGAGCGAA | TCTATTTCTA | :240 |
| Dalbergia cochinchinensis |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia louvelii        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia greveana        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia retusa          |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia cultrate        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia odorifera       |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia oliveri         |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia melanoxyylon    | TGCAAAAATC | GAACATCTTG | TGAAAGTCTT | TTCTAAGAAT | TTTTCGTCTA | CCTTATCATT | CTTCAAGGAT | CCTTTGATTC | :320 |
| Dalbergia cochinchinensis |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia louvelii        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia greveana        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia retusa          |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia cultrate        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia odorifera       |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia oliveri         |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia melanoxyylon    | ATTATGTTAG | ATATCAAGGA | AAAGCCATTC | TGGCTTCAAA | GAATGCGCCT | CTTTTGATGA | ATAAATGGAA | ACACTATCTC | :400 |
| Dalbergia cochinchinensis |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia louvelii        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia greveana        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia retusa          |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia cultrate        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia odorifera       |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia oliveri         |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia melanoxyylon    | ATCTATTTCT | GGCAATGICA | TTTTGATGTT | TGG        |            |            |            |            | :433 |
| Dalbergia cochinchinensis |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia louvelii        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia greveana        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia retusa          |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia cultrate        |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia odorifera       |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| Dalbergia oliveri         |            |            |            |            |            |            |            |            |      |

图 2 黄檀属 8 个种 *matK* 基因部分片段序列 (3 个重复)

Figure 2 Partial sequences of the *matK* gene of eight different *Dalbergia* species (for each species three different samples have been sequenced)

本研究实现了 7 种进口黄檀属木材及 1 种黄檀属叶片的 DNA 提取及 *matK* 片段的 PCR 扩增, 获得序列的碱基位点差异能够将这 8 个树种区分开来, 这为黄檀属木材的分子鉴定工作打下了良好的基础。但是, 由于本次实验样品有限, 来源也比较单一, 要想获得稳定的分子标记, 还需对更多的种类和重复进行进一步的研究。本研究提取的 DNA 虽然能够满足 *matK* 片段的扩增与分析, 但总体质量不高, DNA 的提取和纯化方法仍需进一步改进, 更多的木材种类、不同的取材部位、木材砍伐及存放的时间及环境、对木材进行不同的加工和处理等各种影响 DNA 提取的因素还需要进一步详细研究。

### 参考文献:

- [1] 姜笑梅, 殷亚方, 刘波. 木材树种识别技术现状、发展与展望[J]. 木材工业, 2010, 24(4): 36 - 39.  
JIANG Xiaomei, YIN Yafang, LIU Bo. Current status, development and prospect of wood identification technology [J]. *China Wood Ind*, 2010, 24(4): 36 - 39.
- [2] 伏建国, 刘金良, 杨晓军, 等. 分子生物学技术应用于木材识别的研究世展[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(3): 438 - 443.  
FU Jianguo, LIU jianlinag, YANG xiaojun, *et al*. A review of wood identification based on molecutar biology technologies[J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, 30(30): 438 - 443.
- [3] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al*. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc R Soc*

- Lond B*, 2003, **270**: 313 – 321.
- [4] KRESS W J, WURDACK K J, ZIMMER E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, **102**: 8369 – 8374.
- [5] NEWMASER S G, FAZEKAS A J, RAGUPATHY S. DNA barcoding in the land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach [J]. *Can J Bot*, 2006, **84**: 335 – 341.
- [6] CHASE M W, COWAN R S, HOLLINGSWORTH P M, *et al.* A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, **56**: 295 – 299.
- [7] HOLLINGSWORTH P M, FORREST L L, SPOUGE J L, *et al.* A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, **106**: 12794 – 12797.
- [8] FINKELDEY R, LEINEMANN L, GAILING O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **85**: 1251 – 1258.
- [9] de FILIPPIS L, MAGEL E. Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in Robinia trees using RAPD-PCR [J]. *Trees*, 1998, **12**(6): 377 – 384.
- [10] DUMOLIN-LAPÈGUE S, PEMONGE M H, Gielly L, *et al.* Amplification of oak DNA from ancient and modern wood [J]. *Mol Ecol*, 1999, **8**: 2137 – 2140.
- [11] DEGUILLLOUZ M F, PEMONGE M H, PETIT R J. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA [J]. *Proc Biol Sci*, 2002, **269**: 1039 – 1046.
- [12] REYNOLDS M M, WILLIAMS C G. Extracting DNA from submerged pine wood [J]. *Genome*, 2004, **47**: 994 – 997.
- [13] ASIF M J, CANNON C H. DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2005, **23**: 185 – 192.
- [14] RACHMAYANTI Y, LEINEMANN L, GAILING O, *et al.* Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2006, **24**: 45 – 55.
- [15] OGDEN R, MCGOUGH H N, COWAN R S, *et al.* SNP-based method for the genetic identification of ramin *Gonystylus* spp. timber and products: applied research meeting CITES enforcement needs [J]. *Endangered Species Res*, 2008, **9**: 255 – 261.
- [16] WONG K N, TAN W L, CHEW F T. Identification and characterization of microsatellite loci in *Intsia palembanica* (Leguminosae), a valuable tropical timber species [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, **9**: 360 – 364.
- [17] TANG Xiaoshu, ZHAO Guangjie, PING Liyan. Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, **77**(6): 609 – 617.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18261-2000 红木[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [19] NOVAES R M L, RODRIGUES J G, LOVATO M B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees [J]. *Genet Mol Res*, 2009, **8**: 86 – 96.
- [20] LIEPELT S, SPERISEN C, DEGUILLLOUX M F, *et al.* Authenticated DNA from ancient wood remains [J]. *Ann Bot*, 2006, **98**: 1107 – 1111.
- [21] DEGUILLLOUX M F, PEMONGE M H, BERTEL L, *et al.* Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools [J]. *Mol. Ecol*, 2003, **12**: 1629 – 1636.
- [22] RACHMAYANTI Y, LEINEMANN L, GAILING O, *et al.* DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2009, **3**: 185 – 192.
- [23] BAMBER R K. Heartwood, its function and formation [J]. *Wood Sci Technol*, 1976, **10**: 1 – 8.