

利用 AFLP 进行榧树雌雄株鉴定的初步研究

梁丹, 周秦, 晏燕, 曾燕如, 喻卫武

(浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了解决榧树 *Torreya grandis* 苗期雌雄株鉴别的问题, 利用已建立的扩增片段长度多态 (AFLP) 体系及 T-A 克隆测序, 就榧树的雌雄株开展了研究。结果从 15 对引物中用引物对 E-AGC/M-CAT 得到了一条雌性榧树特异的条带。这条榧树雌性性别特异条带, 仅在雌株、雌雄同株的个体中有, 雄株中没有, 推测榧树雌雄同株由雌性榧树变异而来。GenBank 序列比对结果发现, 数据库没有与此特异条带相匹配的序列。图 6 参 12

关键词: 经济林学; 榧树; 扩增长度多态; 叶; T-A 克隆测序

中图分类号: S664.5; Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)01-0063-05

AFLP-based sexual identification in *Torreya grandis*

LIANG Dan, ZHOU Qin, SHU Yan, ZENG Yan-ru, YU Wei-wu

(Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Torreya* trees can be monoecious or dioecious, and if they are monoecious, the male and female cones may be on different branches. To identify young male and female seedlings of *T. grandis*, an established AFLP (amplified fragment length polymorphism) analysis protocol along with thymine-adenine (T-A) cloning and sequencing were applied to male and female *T. grandis* seedlings using 15 pairs of primers. Results showed that the E-AGC/M-CAT marker revealed a band restricted to the female whose sequence was not matched to any sequence from GenBank. This female-specific band was only available in the female, monoecious *T. grandis* trees. It was inferred that monoecious trees were likely derived from female trees. These results have laid a foundation for subsequent studies. [Ch, 6 fig. 12 ref.]

Key words: cash forestry; *Torreya grandis*; AFLP (amplified fragment length polymorphism); leaf; T-A cloning and sequencing

榧树 *Torreya grandis* 属红豆杉科 Taxaceae 榧树属 *Torreya* 常绿乔木, 雌雄异株, 稀同株, 是我国特有的珍稀经济树种。榧树栽培地方(农家)品种或自然变异类型有细榧 *Torreya grandis* 'Merrillii'、獠牙榧、米榧、芝麻榧、茄榧、旋纹榧、小圆榧、圆榧和大圆榧等, 其中细榧是唯一具有商品性的食用优良品种^[1]。细榧通常被称作香榧, 产区主要分布在浙江诸暨、绍兴等地^[2], 是榧树中的优良类型(单株)经无性繁殖培育而成的榧树优良品种^[3], 也是目前榧树中唯一进行人工规模栽培的品种。香榧栽培区域主要集中在浙江省诸暨、绍兴、嵊州、东阳和磐安交界的会稽山区, 其他地区如杭州市临安、建德、淳安和富阳等县市及邻近如安徽、江西、福建等省有少量的老树和新造林分, 分布范围相对狭窄, 产量极其有限, 所产干果基本靠老林、老树, 增产空间很小。但在自然变异类群中存在不少品质达到或超过香榧的单株, 选种潜力很大。然而榧树存在雌雄同株现象, 在利用接穗进行优株嫁接繁殖

收稿日期: 2008-01-31; 修回日期: 2008-10-06

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(021102537); 浙江林学院人才基金资助项目(R200346)

作者简介: 梁丹, 回族, 硕士, 从事林木生物技术研究。E-mail: liangdanmao@hotmail.com。通信作者: 曾燕如, 教授, 博士, 从事经济林研究与利用研究。E-mail: yzeng@zjfc.edu.cn

时,如何利用分子标记开展榧树性别的早期鉴定,对雌株优树实生苗的性别进行早期鉴定,防止以雄株接穗冒充雌株接穗进行苗木繁殖现象的发生具有重要的意义。由于植物性别早期鉴定的难度远远大于动物,所以这方面的研究较少。扩增片段长度多态(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记由于引物设计的巧妙与搭配的灵活,操作的方便,使它成为当今获得多态性效率最高的分子标记。目前,在植物中利用 AFLP 开展性别研究的树种包括石刁柏 *Asparagus officinalis*^[4], 猕猴桃 *Actinidia deliciosa*^[5], 银杏 *Gingo biloba*^[6], 番木瓜 *Carica papaya*^[7], 罗汉果 *Momordica grosvenori*^[8], 叉枝蝇子草 *Silene latifolia*^[9], 大麻 *Cannabis sativa* subsp. *indica*^[10]等。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验材料为榧树的叶片。2005年4月下旬陆续从榧树主要产区采样。考虑到目前香榧雌株普遍有嫁接繁殖的现象,故在采集香榧雌株样品时特别考虑彼此间的地理距离。雌株包括来源于诸暨十里牌(1株)、钟家岭(1株)的香榧,诸暨钟家岭(1株)的圆榧;磐安尚湖(3株)、窈川(2株)、玉山镇(2株)的香榧;磐安尚湖(2株)、玉山镇(1株)、墨林(1株)、大盘(1株)的木榧;绍兴稽东(4株)的木榧与(3株)香榧。雄株的样品来自淳安临歧镇(1株)、临安的湍口镇(6株)与西天目山(8株)、诸暨的十里牌(5株)与钟家岭(1株)。野外采样时,榧树叶片用硅胶干燥,带回实验室后,于-40℃储存待用。

1.2 方法

采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)裂解-硅珠吸附法提取叶片高质量的DNA,其 $D_{0.260}/D_{0.280}$ 值大多为1.8~2.0,且琼脂糖凝胶电泳条带明亮、清晰。在此基础上建立了AFLP实验分析体系^[11]。利用该体系及筛选出的15对适用于叶片AFLP分析的引物对就样品DNA进行分析,采用 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,70W恒功率电泳至上样缓冲液中溴酚蓝带跑出胶板。

对获得的雌性性别特异条带用同样的引物对进行二次扩增,扩增体系含 *EcoR* 引物($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), *Mse* 引物($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $10\times\text{PCR Buffer}$, $\text{dNTP}(10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 上海生物工程有限公司), 氯化镁($25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), *Taq* 酶($5\times 16.67\ \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$, Promega), ddH_2O , 模板(干胶)。反应条件为 $94\ ^\circ\text{C}\ 2\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $52\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}\ 1\ \text{min}$, 共40个循环; $72\ ^\circ\text{C}\ 5\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保持。扩增产物用 QIAquick gel extraction kit(QIAGEN)进行割胶纯化,将纯化后的扩增产物与 pGEM-T Easy 载体(Promega)相连,转化感受态的大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , $37\ ^\circ\text{C}$ 摇菌过夜。挑白色单菌落培养后直接用菌液进行聚合酶链式反应(PCR),菌液 PCR 的反应体系同前,反应条件为 $94\ ^\circ\text{C}\ 2\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $57\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}\ 1\ \text{min}$, 共30个循环; $72\ ^\circ\text{C}\ 5\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保持。菌液 PCR 产物用 $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶进行电泳。另一方面用纯甘油(与菌液混合后占总体积的15%)- $80\ ^\circ\text{C}$ 保存菌液,送上海生物工程有限公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 香榧雌株与榧树雄株的性别鉴定

取香榧雌株的叶片DNA样品和榧树雄株叶片DNA样品各10个进行AFLP分析,虽然有不少引物对的条带非常丰富,但都没有性别特异的条带(图1)。通过大量的实验,在引物对E-AGC/M-CAT的扩增产物中找到了一条性别特异的条带(图2)。随后,又各增加10个雌雄株的DNA进行验证,证明获得的条带确实是香榧雌株特有的性别特异性条带(图3),大小为400~600bp。由于变性聚丙烯酰胺胶(PAGE)电泳时使用的是适用于琼脂糖凝胶电泳的Marker,而PAGE胶的分辨率比琼脂糖凝胶要高得多,因此,琼脂糖凝胶电泳的Marker在PAGE胶上不能完全说明性别特异性条带的大小。此外,不同的玻璃板上的胶在电泳时间上也有差异,结果造成条带之间的距离不同。

2.2 香榧雌株及榧树其他自然变异类型雌株的性别鉴定

用引物组合E-AGC/M-CAT对香榧雌株及榧树其他自然变异类型(如木榧、圆榧等)的雌株进行

AFLP 分析, 结果发现在这些自然变异类型中扩增出了与香榿一样的条带, 彼此之间没有差异 (图 4)。图 4 中各个泳道分别对应的是: 1-香榿, 2-香榿, 3-木榿, 4-木榿, 5-香榿, 6-香榿, 7-圆榿。

2.3 榿树雌株及雌雄同株个体的性别鉴定

榿树稀有雌雄同株的现象。以前人们在野外观察到的只是雌性大树上具有雄性大枝或相反的现象, 这多半是嫁接的结果。但近年的发现有所不同, 所谓的雌雄同株是在同一株树上既有雌球花 (常表现为幼果) 与雄球花同时着生于同一小枝上, 又有雌球花 (常表现为幼果) 与雄球花分别着生在不同小枝上的植株, 尽管这样的个体至今只发现不到 10 株。

用引物组合 E-AGC/M-CAT 对香榿雌株, 包含木榿、圆榿在内的榿树其他自然变异类型的雌株、雌雄同株个体进行 AFLP 分析, 结果发现这些榿树纯雌株与雌雄同株之间扩增出了相同的性别特异条带 (图 5)。

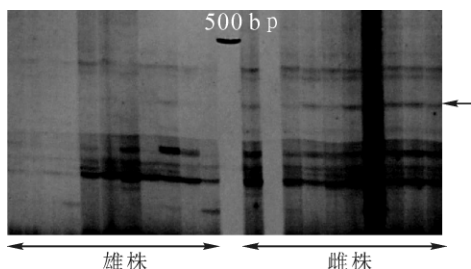


图 2 E-AGC/M-CAT 引物组合对香榿雌株和榿树雄株叶片 DNA 的选扩结果 (图中箭头所指为性别特异性条带)

Figure 2 Leaf DNA fragments selectively amplified by the primer combination of E-AGC/M-CAT, indicating the difference between the male of *Torreya grandis* and the female of *Torreya grandis* 'Merrillii' (The arrow indicates the female specific band)

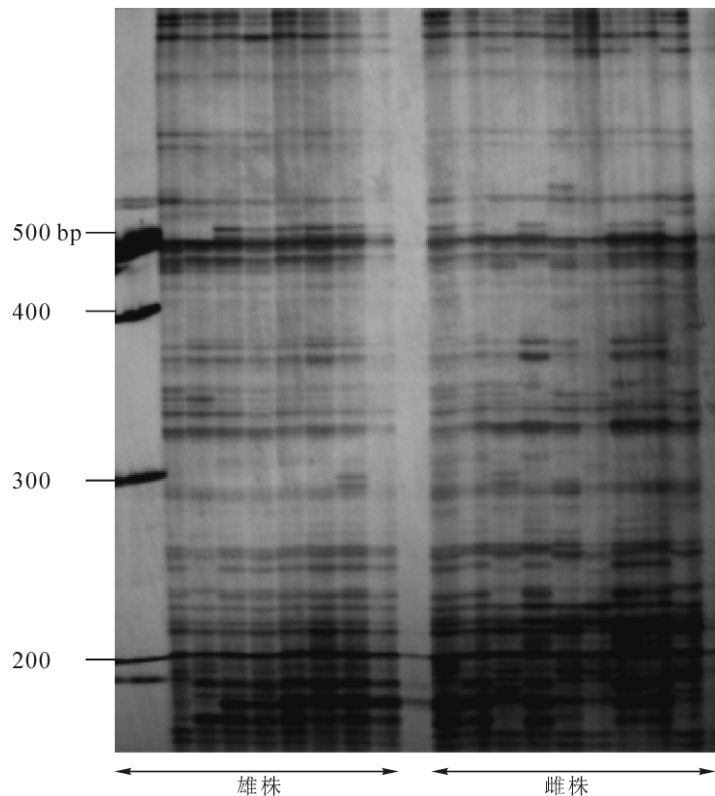


图 1 E-ACG/M-CAA 引物组合对香榿雌株和榿树雄株叶片 DNA 的选扩结果

Figure 1 Leaf DNA fragments selectively amplified by the primer combination of E-ACG/M-CAA, indicating no difference between the male of *Torreya grandis* and the female of *Torreya grandis* 'Merrillii'

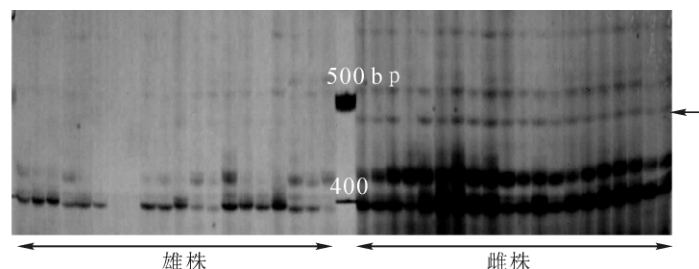


图 3 选扩结果的验证 (图中箭头所指为性别特异性条带)

Figure 3 Confirmation of the result indicating the difference between the male of *Torreya grandis* and the female of *Torreya grandis* 'Merrillii' (The arrow indicates the female specific band)

结果说明, 引物对 E-AGC/M-CAT 获得的雌性榿树特异的条带, 可以对榿树的雌、雄株进行鉴别, 但不能区分雌株与雌雄同株的个体, 也不能区分同是雌性的品种香榿与其他自然变异类型的榿树, 亦即个体只要有雌球花, 不管它是纯雌株还是雌雄同株, 都能扩增出这个特异的条带。本研究也曾尝试过其他引物对, 但都未能将雌株和雌雄同株个体区分开来。后续研究还有待于进一步深入。

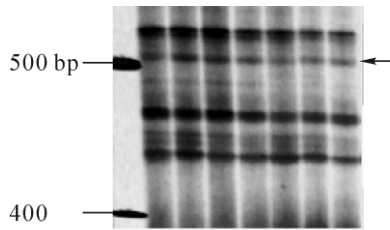


图4 香榧雌株及榧树其他自然变异类型雌株叶片DNA的选扩结果(图中箭头所指为性别特异性条带)

Figure 4 Leaf DNA fragments selectively amplified by the primer combination of E-AGC/M-CAT, indicating no difference among the female of *Torreyia grandis* 'Merrillii' and the other female variants of *Torreyia grandis*

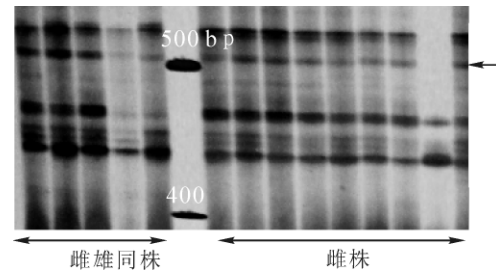


图5 榧树雌株及雌雄同株个体叶片DNA的选扩结果(图中箭头所指为性别特异性条带)

Figure 5 Leaf DNA fragments selectively amplified by the primer combination of E-AGC/M-CAT, indicating no difference between the female and the monoecia

2.4 雌性榧树特异 AFLP 条带的克隆测序

将 AFLP 分析获得的雌性榧树特异条带进行 2 次 PCR, PCR 产物 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳的结果显示, 片段大小为 $200 \sim 300 \text{ bp}$ 。

PCR 产物经割胶纯化, 连接 T 载体, 并转化大肠杆菌。部分大肠杆菌在摇菌培养的过程中裂解, 释放出载体, 而目标片段在载体中, 因此可以对菌液直接进行 PCR。对含有转化子的大肠杆菌进行 PCR, PCR 产物的片段大小为 $200 \sim 300 \text{ bp}$ (图 6)。这 2 个 PCR 的结果说明, 琼脂糖凝胶电泳 Marker 在 PAGE 胶上不能正确说明条带的大小。测序结果除去载体序列后片段大小为 228 bp 。将这些片段与 GenBank 现有的序列进行比对, 发现没有匹配的同源序列。结果还需开展进一步的研究。

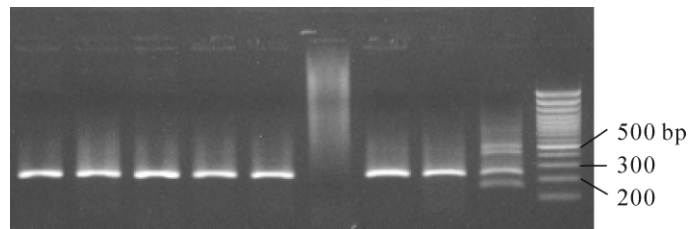


图6 含有转化子菌液的 PCR 结果

Figure 6 The PCR result of transformant-containing *Escherichia coli*

3 讨论

利用引物对 E-AGC/M-CAT 及 AFLP 标记对榧树雌雄株进行鉴别, 只能鉴别雌雄性, 不能区分雌株及雌雄同株。因此, 初步推测可能只有榧树雌株有可能产生雄球花, 但其中的原因还有待于进一步研究。

榧树为裸子植物, 童期至少 10 a 以上, 香榧嫁接后 4 ~ 6 a 可以开花结实^[1]。其胚乳(大配子体)的基因型与母本的配子相同, 在遗传上相当于单倍体的子代。不管花粉的贡献率如何, 任何母本中杂合的位点在大配子体里均以 1 : 1 的比例分离^[12], 结果大配子体中获得的显性标记与共显性标记的信息量是一样的。也就是说, 用显性标记与共显性标记对榧树种子中的胚乳进行分析, 效果是一样的。尽管我们已建立了胚乳的 AFLP 分析体系^[12], 在性别鉴定上也可以胚乳 DNA 为材料, 但胚乳材料在数量及取样时间上具有局限性。因此, 利用营养器官叶片的 DNA 对它们进行性别鉴定, 应用的前景更好。

参考文献:

- [1] 黎章矩, 高林, 王白坡, 等. 浙江省名特优经济树种栽培技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995.
- [2] 黎章矩, 程晓建, 戴文圣, 等. 浙江香榧生产历史、现状与发展[J]. 浙江林学院学报, 2004, 21 (4): 471 - 474.
LI Zhangju, CHENG Xiaojian, DAI Wensheng, et al. History and status and development of *Torreyia grandis* in Zhejiang Province[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2004, 21 (4): 471 - 474.
- [3] 黎章矩, 程晓建, 戴文圣, 等. 香榧品种起源考证[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22 (4): 443 - 448.
LI Zhangju, CHENG Xiaojian, DAI Wensheng, et al. Origin of *Torreyia grandis* 'Merrillii' [J]. *J Zhejiang For Coll*,

- 2004, **21** (4): 471 – 474.
- [4] SPADA A, CAPORALI E, MARZIANI C, *et al.* A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 1083 – 1088.
- [5] 张潞生, 李传友, 贾建航, 等. 猕猴桃雌雄性别的 AFLP 鉴别中 DNA 模板的制备[J]. 果树科学, 1999, **16** (3): 171 – 175.
- ZHANG Lusheng, LI Chuanyou, JIA Jianhang, *et al.* Making DNA template in the study of sex determination in *Actinidia* by AFLP[J]. *J Fruit Sci*, 1999, **16** (3): 171 – 175.
- [6] 王晓梅, 宋文芹, 李秀兰, 等. 银杏雌雄基因组 DNA 间的差异性分析[J]. 细胞生物学杂志, 2002, **24** (1): 38 – 41.
- WANG Xiaomei, SONG Wenqin, LI Xiulan, *et al.* Analysis of genomic DNA between male and female in a dioecious plant, *Ginkgo biloba*[J]. *Chin J Cell Biol*, 2002, **24** (1): 38 – 41.
- [7] MA H, MOORE P H, LIU Z, *et al.* High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in *Papaya*[J]. *Genetics*, 2004, **166**: 419 – 436.
- [8] 陶莉, 王跃进, 尤敏, 等. AFLP 用于构建罗汉果 DNA 指纹图谱及其幼苗雌雄鉴别[J]. 武汉植物学研究, 2005, **23** (1): 77 – 80.
- TAO Li, WANG Yuejin, YOU Min, *et al.* Construction of AFLP fingerprints and seedling sex discrimination of *Siraitia grosvenori* (Swingle)[J]. *J Wuhan Bot Res*, 2005, **23** (1): 77 – 80.
- [9] HARDENACK S L, HAUSER E, LAW T F, *et al.* Mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism[J]. *Genetics*, 2002, **160**: 717 – 725.
- [10] FLACHOWSKY H, SCHUMANN E, WEBER W E, *et al.* Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in Hemp[J]. *Plant Breed*, 2001, **120**: 305 – 309.
- [11] 梁丹, 吴勇, 曾燕如, 等. 香榧 AFLP 实验体系的建立[J]. 福建林业科技, 2007, **34** (2): 93 – 94.
- LIANG Dan, WU Yong, ZENG Yanru, *et al.* Establishment of an AFLP system in *Torreya grandis* [J]. *J Fujian For Sci Technol*, 2007, **34** (2): 93–94.
- [12] WILCOX P L, AMERSON H V, KUHLMAN E G, *et al.* Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (9): 3859 – 3864.