

中华人民共和国林业行业标准

LY/T 3107—2019

柳树品种微卫星标记鉴别技术规程

Technical regulation for willow varieties identification by SSR markers

(发布稿)

行业标准信息服务平台

2019 - 10 - 23 发布

2020 - 04 - 01 实施

国家林业和草原局 发布

前 言

本标准按照GB/T1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由全国林木种子标准化技术委员会（SAC/TC 115）提出并归口。

本标准主要起草单位：南京林业大学。

本标准参加起草单位：江苏省林业科学研究院；山东省林业科学研究院。

本标准主要起草人：李淑娴、戴晓港、尹佟明、陈赢男、刘德玺、何旭东。

行业标准信息服务平台

柳树品种微卫星标记鉴别技术规程

范围

本标准规定了以柳属(*Salix*)植物 DNA 为材料, 利用微卫星标记(microsatellite)对国家和省审(认)定的柳树品种进行分子鉴定的规范化操作技术。

本标准适用于附录 A 中所列柳树品种的鉴别。

2 术语和定义

2.1 微卫星标记 microsatellite

微卫星标记, 又被称为短串联重复序列(short tandem repeats, STRs)或简单重复序列(simple sequence repeats, 简称 SSR), 是指基因组中由 2~6 个核苷酸组成的 DNA 串联重复序列。

2.2 基因型频率 genotype frequency

基因型频率指不同基因型在全部个体中所占的比率, 全部基因型频率的总和为 1 或 100%。

3 操作程序

3.1 取样和保存

取柳树幼嫩叶片 5 片~10 片, 用干燥硅胶密封保存, 用于 DNA 提取。

3.2 DNA 提取所需试剂

- a) 1 M Tris: 称取 12.11 g Tris 溶解到 80 mL 超纯水中, 调节 pH=8.0, 定容到 100 mL。
- b) 0.5 M EDTA: 称取 18.61 g EDTA 溶解到 80 mL 超纯水中, 调节 pH=8.0, 定容到 100 mL。
- c) 5 M 氯化钠: 称取 23.38 g 氯化钠溶解到 80 mL 超纯水中, 定容到 100 mL。
- d) 5 M 醋酸钾: 称取 25.54 g 醋酸钾, 200 mL 超纯水溶解后定容到 250 mL。
- e) 2% SDS: 称取 1.0 g 十二烷基硫酸钠(SDS), 40 mL 超纯水溶解后定容到 50 mL。
- f) 10% CTAB: 称取 10 g CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)溶解到 80 mL 超纯水中, 定容到 100 mL。
- g) 氯仿异戊醇: 240 mL 氯仿, 10 mL 异戊醇混合。
- h) 70% 乙醇: 70 mL 乙醇, 加入 30 mL 超纯水。
- i) CTAB 裂解液: 1 mL 1 M Tris(pH=8.0), 4 mL 0.5 M EDTA(pH=8.0), 28 mL 5 M 氯化钠, 10 mL 10% CTAB, 5 g 聚乙烯吡咯烷酮, 定容到 100 mL。
- j) TBE 缓冲液(10×): 称取 108 g Tris 碱和 55 g 硼酸, 加入 40 mL 0.5 M EDTA 溶液 (pH=8.0), 用

800 mL 双蒸水溶解后定容到 1 L，高温灭菌。

3.3 DNA 提取

DNA 提取采用改良的 CTAB 法：

- a) 向 2 mL 离心管中加入 400 μL CTAB 裂解液，10 μL 的 10 mg/mL Rnase，2 μL β -巯基乙醇。
- b) 取柳树叶片 3-5 片，放入研钵中加入液氮充分研磨，将研磨后的样品转入 3.2.1 的离心管中，涡旋混匀后，65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min，再加入 400 μL 2% SDS，涡旋混匀，65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。
- c) 向 3.2.2 的离心管中加入 130 μL 5 M 醋酸钾，涡旋混匀，将离心管插入冰中保存 10 min。
- d) 加入 800 μL 氯仿异戊醇溶液(氯仿:异戊醇=24:1)，涡旋混匀后，12000 rpm 离心 5 min。
- e) 将上清液转移到新的 2 mL 离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，颠倒离心管 8-10 次，-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 20 min。
- f) 取出离心管，12000 rpm 离心 5 min，去除上清液。
- g) 加入 500 μL 的 70% 乙醇，12000 rpm 离心 2 min，去除上清液。
- h) 重复 3.2.7 步骤一次。
- i) 加入 500 μL 无水乙醇，12000 rpm 离心 5 min，去除上清液，离心管开盖室温放置 30 min。
- j) 加入 100 μL TE 缓冲液，37 $^{\circ}\text{C}$ 保存 5 min，涡旋混匀获得 DNA，将样品放在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

3.4 DNA 定量及质量检测

- a) 取 2 μL DNA 用微量核酸蛋白检测仪检测，直接读出 DNA 浓度和 A260/280 的比值。
- b) 根据上述测定浓度，取 200 ng DNA，加入 2 μL 溴酚蓝，在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳，加入 5000 bp marker 作对照，稳压 100 V，电泳缓冲液为 1 \times TBE，电泳结束后用凝胶成像系统记录拍照。
- c) 根据微量核酸蛋白检测仪的定量结果，将样品稀释成 20 ng/ μL ，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

3.5 目的片段 PCR 扩增

3.5.1 16 对 SSR 引物及序列见附录 B。

3.5.2 目的片段扩增反应体系为 15 μL ，具体试剂用量见表 1。

表 1 PCR 扩增反应体系

试剂	浓度	所需体积(μL)
PCR buffer	10 \times PCR buffer(Mg ²⁺ Plus)	1.5
Taq 酶	5 U/ μL	0.2
Forward Primer	5 mM	1
Revere Primer	5 mM	1
DNA	20 ng/ μL	2
dNTP	5 mM	0.3
dUTP	250 nM	1

H ₂ O		6.8
------------------	--	-----

3.5.3 PCR 扩增反应

将配制的扩增体系加入到 8 连管或 96 孔 PCR 板中，盖上管盖后涡旋混匀，在 3000 rpm 下离心 5 s，放入 PCR 仪中扩增，扩增程序为：

- 1) 94 °C 变性 4 min；
- 2) 94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环；
- 3) 72 °C 延伸 10 min，15 °C 保存。

3.6 目的片段检测

3.6.1 PCR 产物变性

PCR 产物用双蒸水稀释 10-15 倍，取 1 μL 稀释产物加入到 9 μL 的 Loading buffer (91% 超纯甲酰胺，9% 内标 Genescan 500 Rox) 后混匀；在 PCR 仪上运行变性程序：95 °C 变性 5 min，迅速放冰上冷却。

3.6.2 PCR 扩增产物检测

PCR 产物检测采用 ABI PRISM 3130xl 分析系统。从数据采集软件中创建一个片段分析程序，选择片段分析模式以及光谱校正所用试剂盒类型。创建一个自动分析模板，填写分析样品名称，选择样品类型、内标类型、分析方法等。将变性的产物转入 96 孔 PCR 板，盖上仪器自带的 PCR 板盖，放入仪器中。在软件中将 PCR 板链接到仪器，点击开始进行基因型分型。

3.6.3 PCR 扩增产物条带分析

采用基因型分析软件打开基因型分型的结果，根据内参大小直接读出每个样品目的片段的大小。

4 送检样品分析

送检样品分析程序为：

- a) 随机选取附录 B.1 中的一对 SSR 引物，对待检样品进行 PCR 扩增。
- b) 将待检样品扩增得到的条带和附录 C.1-C.2 中对应引物的标准谱带相比较。
- c) 如果所有扩增条带和附录 C.1-C.2 中对应引物某一品种的标准谱带完全相同，即判定为相同品种；如果扩增条带和其中几个品种的条带完全相同，则增加一对引物进行检测，直至检测到唯一匹配的品种。
- d) 如果待检样品所有扩增条带有一个以上位点与标准谱带不同，即判定为不同品种。
- e) 根据基因型频率判定所鉴定品种真实性的准确率，见附录 D。

附录 A
(资料性附录)
本标准适用鉴定的柳树品种表

表 A.1 本标准适用鉴定的柳树品种

序号	品种中文名	拉丁名
1	苏柳 172	<i>Salix jiangsuensis</i> CL 'J172'
2	苏柳 485	<i>S. jiangsuensis</i> CL '485'
3	苏柳 52-2	<i>S. jiangsuensis</i> CL '52-2'
4	苏柳 795	<i>S. jiangsuensis</i> CL 'J795'
5	苏柳 799	<i>S. jiangsuensis</i> CL 'J799'
6	苏柳 J932	<i>S. jiangsuensis</i> CL 'J932'
7	簸杞柳 JW9-6	<i>S. integra</i> × <i>S. suchowensis</i> 'JW9-6'
8	簸杞柳 JW8-26	<i>S. suchowensis</i> × <i>S. integra</i> 'JW8-26'
9	“旱沙王”北沙柳	<i>S. psammophila</i> 'Hanshawang'
10	银芽柳 J1037	<i>S. agyrobactealis</i> 'J1037'
11	银芽柳 J1050	<i>S. agyrobactealis</i> 'J1050'
12	银芽柳 J1055	<i>S. agyrobactealis</i> 'J1055'
13	银芽柳 J887	<i>S. agyrobactealis</i> 'J887'
14	金丝垂柳 J1010	<i>S. aureo-pendula</i> 'J1010'
15	金丝垂柳 J1011	<i>S. aureo-pendula</i> 'J1011'
16	花叶柳	<i>S. integra</i> var. 'Hakuro Nishiki'
17	渤海柳 1 号	<i>S. matsudana</i> Koidz 'Bohailiu-1'
18	渤海柳 2 号	<i>S. matsudana</i> Koidz 'Bohailiu-2'
19	渤海柳 3 号	<i>S. matsudana</i> Koidz 'Bohailiu-3'
20	渤海柳 4 号	<i>S. matsudana</i> Koidz 'Bohailiu-4'
21	旱柳	<i>S. matsudana</i> Koidz
22	沙柳	<i>S. psammophila</i>
23	黄柳	<i>S. gordejevii</i> Chang et SkV.

附录 B
(规范性附录)
柳树品种鉴别 16 对 SSR 引物序列

表 B.1 柳树品种鉴别的 16 对 SSR 引物

序号	引物名称	引物正向序列(5'-3')	引物反向序列(5'-3')
1	W254-1	AACATTCTGCTTCTTCCTTT	AACCTCCATTACCATCCATA
2	W46-460	AAGCAAGCAAAAGTCAAGAG	AGTATGCCAAGCAAGAAGAA
3	W64-41	TCAGAGCCTGGTTCATAA	ACAAATGCCAGAGCTAAA
4	W64-65	GCATACTTGGGCGTTGAT	TGACTTGGGTTGGGTTTT
5	W64-255	GTCTGAACCCTCATCTAT	CTGGAATCCATAATACAC
6	W64-272	TCACTTGCCGCCCTTCTT	TGACGCCGCTGTAACCAC
7	W64-286	AAAGAATACATTTTAGGTGGAT	TTCAAGGTTCAATCAAGTTA
8	W64-293	GCAAAAGCCAAAAGGAGA	AACCAGCAGAGGAAAGTG
9	W64-311	AGAGCAAAGCACATTCA	ATACATCTACTGCCACCC
10	W253-12	ATCAAATCACGCTAATCC	AACAAGAAAGCAACATCG
11	W253-17	ATTGAATGGGCACTAACC	GCACTTCCACCTACCTCC
12	W253-38	CCCACCAAAGCGTCTGTC	CGAGTTGTITGGGCTGGAT
13	W253-47	TTATTGCTGGAAAGGTTG	TTCGTGTCTTTAGGGTCT
14	W-292-5	AAAGAAGGCAAACAAGCA	AAACAGCGAAAGAAGCAAA
15	W253-22	GCCTCTGTCCCATGACC	TGAGGACTGGAGCGGATT
16	W-265-23	TGGGAGGAGTGTCAGAAG	CTCCATAACAACCAGCAA

行业标准信息平台

附录 C
(资料性附录)

16 对引物鉴定柳树品种指纹图谱表

表 C.1 引物 W254-1、W46-460、W64-41、W64-65、W64-255、W64-272、W64-286 和 W64-293 鉴定柳树品种指纹图谱表

品 种	引 物																							
	W254-1			W46-460			W64-41				W64-65				W64-255		W64-272			W64-286			W64-293	
苏柳 172	389			457	469		155	167	251	285	222	228	244	258	223		153	220	224	253	258	277	255	264
苏柳 485	380	390		463			251	286			277				224		224			254	258	282	243	254
苏柳 52-2	390	398		465	472		155	167			170	222			221	225	188			270			254	257
苏柳 795	343	390		457	472		155	167	275		128	228			191	226	220	224		284			255	
苏柳 799	342	390		457	472		251	285			128	222	228	244	220	223	220	224		277			255	
苏柳 J932	343	389		457	463		155	167	212	257	128				224		224			277	282	292	255	
簸杞柳 JW9-6	380	398		457	472		251	285			222				220	223	188	220		270	298		257	264
簸杞柳 JW8-26	398			465			167				232	319			221	225	188			267			242	254
“旱沙王”北沙柳	343	393		456			155	167			128	235	277	381	224		220	224		270			247	257
银芽柳 J1037	401			456	465		155	167			251	319			220	223	188	222		307	319		266	
银芽柳 J1050	398			456	475		155	167			228	251			220	223	188			258	262		242	266
银芽柳 J1055	401			456	465		155	167			277	361			224		188			307	319		266	
银芽柳 J887	380	398		459			167				222	277			221	225	188	220		270	299		239	266
金丝垂柳 J1010	343	393		457	463	470	155	167	275	285	128	222	235		191	226	159	220	224	284			247	257
金丝垂柳 J1011	343	393		457			155	167	251	285	128	222	235		223		220	224		270	285		247	257
花叶柳	390	398		457			167				222	319			220	223	188	220		291			243	264
渤海柳 1 号	343	389		457	469		155	212			228	232	257	262	224		153	200	224	277	282		255	
渤海柳 2 号	389			459	467		155				235	361	381	368	224		200			254	258	262	243	257
渤海柳 3 号	390			456	465	469	155	159	167		228	236	381		224		220			254	258	277	255	264
渤海柳 4 号	343	393		456	469		155	167	212		228	236	381		224		200	220	224	258	277		247	257

旱柳	390			459	466		167				128	166	277	381	224	256	200			258	282		245	264	278
沙柳	379	393	395	467			212	239	257	285	162	170	228	319	218	224	222			286	294		250	257	
黄柳	381	389					159	167	212	257	128	381			224		224	251		271	277	301	241	255	

表 C.2 引物 W64-311、W253-12、W253-17、W253-38、W253-47、W292-5、W253-22 和 W265-23 鉴定柳树品种指纹图谱表

品 种	引 物																								
	W64-311			W253-12			W253-17			W253-38				W253-47		W292-5				W253-22			W265-23		
苏柳 172	158	176		241	255		222	232		202	213	237	242	227		174	188			287	321	349	270	288	
苏柳 485	158	176		241			191	232		202	213	234		227	231	174	179			271	289		264	288	
苏柳 52-2	170			241			195			235				227	237	174	176			271	289		288	293	
苏柳 795	158	183		241	255		222			213	237			225		174	179	188		253	287	321	270	288	303
苏柳 799	158	180		241	255		222	232		213	237			225		174	188			321			270		
苏柳 J932	158	176	196	241			199	218	232	202	213	237	242	227	231	169	174	188		321			244	263	
簸杞柳 JW9-6	164	170		241			204			235				227	233	174	176			253	287		288	293	
簸杞柳 JW8-26	180			241			194	202		240				225	237	174				321			288	293	
“旱沙王”北沙柳	176			241	255		184	222	232	202	213	237	242	227		174	188			321	349		270	288	297
银芽柳 J1037	164			243	253		189	194		240				237	243	170	174			320	357		291		
银芽柳 J1050	180			243	251		189	194		240				230	237	170	174			320	357		291		
银芽柳 J1055	160	164		243	251		189			240				237	243	170	174			320	357		291		
银芽柳 J887	160	181		241			202			240				233		170	174			321			288	297	
金丝垂柳 J1010	176	183		241	255		222			202	213	237	242	225		174	179	188		253	287		270		
金丝垂柳 J1011	176	183		241	255		222			202	213	237	242	225		174	179	188		253	287		270	288	
花叶柳	164			241			204			240				233	246	174	182			321			288	293	
渤海柳 1 号	158	183		241	251	255	188	230		213	237			227		170	174	179	188	321			270	288	297
渤海柳 2 号	176	183		243	251		190	220	232	202	213	237	242	227		170	174	179		321			270	288	297
渤海柳 3 号	176			241	255		188	211	230	202	213	237	242	227		174	188			321			270	288	297
渤海柳 4 号	183			241	255		188	230		213	237			227		174	188			321			270	288	297

旱柳	158	176	203	241			189	201	232	202	213	237	242	227		174				321			288	297	
沙柳	172	203	223	243	251		198			242				227	233	174	176			307	321		267	291	
黄柳	158	180	189	241			191	232		202	213	237	242	227		174				321			288		

行业标准信息平台

附录 D
(资料性附录)
各引物鉴定柳树品种基因型频率表

表 D.1 各引物鉴定柳树品种基因型频率表

序号	品种名称	引 物																16 个位点 基因型相 同概率
		W254-1	W46-460	W64-41	W64-65	W64-255	W64-272	W64-286	W64-293	W64-311	W253-12	W253-17	W253-38	W253-47	W292-5	W253-22	W265-23	
1	苏柳 172	0.08	0.08	0.08	0.04	0.08	0.04	0.04	0.08	0.08	0.36	0.08	0.36	0.36	0.24	0.04	0.08	4.81E-17
2	苏柳 485	0.04	0.04	0.04	0.04	0.08	0.08	0.04	0.04	0.08	0.36	0.08	0.04	0.08	0.04	0.08	0.04	2.47E-20
3	苏柳 52-2	0.08	0.04	0.28	0.04	0.12	0.2	0.12	0.04	0.04	0.36	0.04	0.08	0.04	0.12	0.08	0.16	1.17E-17
4	苏柳 795	0.04	0.12	0.04	0.04	0.08	0.2	0.08	0.16	0.08	0.36	0.12	0.16	0.16	0.12	0.04	0.04	2.67E-17
5	苏柳 799	0.04	0.12	0.08	0.04	0.24	0.2	0.04	0.16	0.04	0.36	0.08	0.16	0.16	0.24	0.44	0.08	1.18E-15
6	苏柳 J932	0.08	0.04	0.04	0.04	0.32	0.08	0.04	0.16	0.04	0.36	0.04	0.36	0.08	0.04	0.44	0.04	9.80E-18
7	簸杞柳 JW9-6	0.08	0.12	0.08	0.04	0.24	0.12	0.04	0.2	0.04	0.36	0.08	0.08	0.08	0.12	0.12	0.16	1.20E-16
8	簸杞柳 JW8-26	0.12	0.04	0.16	0.04	0.12	0.2	0.04	0.04	0.12	0.36	0.04	0.28	0.04	0.12	0.44	0.16	1.93E-16
9	‘旱沙王’北沙柳	0.2	0.08	0.28	0.08	0.32	0.2	0.04	0.2	0.12	0.36	0.08	0.36	0.36	0.24	0.08	0.24	3.79E-13
10	银芽柳 J1037	0.08	0.08	0.28	0.04	0.24	0.04	0.08	0.08	0.08	0.04	0.12	0.28	0.08	0.2	0.16	0.16	1.94E-16
11	银芽柳 J1050	0.12	0.08	0.28	0.08	0.24	0.2	0.08	0.08	0.12	0.2	0.12	0.28	0.08	0.2	0.16	0.16	2.18E-14
12	银芽柳 J1055	0.08	0.08	0.28	0.04	0.08	0.2	0.08	0.08	0.04	0.2	0.04	0.28	0.08	0.2	0.16	0.16	2.69E-16
13	银芽柳 J887	0.08	0.04	0.16	0.04	0.12	0.12	0.04	0.04	0.04	0.36	0.04	0.28	0.04	0.2	0.44	0.08	2.14E-17
14	金丝垂柳 J1010	0.2	0.04	0.04	0.08	0.08	0.04	0.08	0.2	0.12	0.36	0.12	0.36	0.16	0.12	0.12	0.08	4.51E-16
15	金丝垂柳 J1011	0.2	0.08	0.08	0.08	0.08	0.2	0.04	0.2	0.12	0.36	0.12	0.36	0.16	0.12	0.12	0.08	4.51E-15
16	花叶柳	0.08	0.08	0.16	0.04	0.24	0.12	0.04	0.04	0.08	0.36	0.08	0.28	0.04	0.04	0.44	0.16	1.37E-16
17	渤海柳 1 号	0.08	0.08	0.04	0.04	0.32	0.04	0.04	0.16	0.08	0.04	0.08	0.16	0.36	0.04	0.44	0.24	5.22E-17
18	渤海柳 2 号	0.08	0.04	0.04	0.04	0.32	0.08	0.04	0.04	0.12	0.2	0.04	0.36	0.36	0.04	0.44	0.24	1.10E-16
19	渤海柳 3 号	0.08	0.04	0.04	0.08	0.32	0.04	0.04	0.08	0.12	0.36	0.04	0.36	0.36	0.24	0.44	0.24	2.38E-15
20	渤海柳 4 号	0.2	0.04	0.04	0.08	0.32	0.04	0.04	0.2	0.04	0.36	0.08	0.16	0.36	0.24	0.44	0.24	4.41E-15
21	旱柳	0.08	0.04	0.16	0.04	0.04	0.08	0.04	0.04	0.04	0.36	0.04	0.36	0.36	0.12	0.44	0.08	3.31E-17

22	沙柳	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.2	0.04	0.04	0.08	0.12	0.44	0.04	1.42E-20
23	黄柳	0.04	0.04	0.04	0.04	0.32	0.04	0.04	0.04	0.04	0.36	0.08	0.04	0.36	0.12	0.04	0.04	1.67E-19

行业标准信息平台