

甜高粱抗丝黑穗病分子标记的建立

魏鑫 陆水怡 庄严, 李玥莹* (沈阳师范大学化学与生命科学学院, 辽宁沈阳 110034)

摘要 [目的] 在甜高粱丝黑穗病基因的分子标记研究上有所进展。[方法] 以甜高粱抗丝黑穗病品种LTR102、甜高粱感丝黑穗病品种LTR106为试材,应用SSR技术对甜高粱丝黑穗病基因进行分子标记的初步分析。试验中采用CTAB方法提取甜高粱基因组。[结果] 通过比较Taq酶用量的不同,进一步优化了Taq酶的用量。用SSR分子标记技术对其进行多态性扩增,所用的20个SSR引物中有16个引物能扩增出清晰的多态性谱带,完全可应用于甜高粱丝黑穗病抗病基因的初步定位。其中有4个引物扩增出了差异带,引物号为: Xxp279、Xxp284、Xxp36、Xxp228。[结论] 通过比较体系中各不同因素的影响,进一步优化了SSR反应体系,达到了较理想的检测效果。

关键词 甜高粱;SSR;分子标记;丝黑穗病

中图分类号 S514 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15794-03

Research on the Establishment of Molecular Marker System for Anti-smut Wire of Sweet Sorghum

WEI Xin et al. (College of Life Science and Chemistry, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034)

Abstract [Objective] The research progress of the molecular marker of sweet sorghum smut wire gene was reviewed. [Method] The sweet sorghum variety with anti-smut silk——LTR102 and the sweet sorghum variety with the sensitive to head smut——LTR106 being used as experimental material, the SSR technology was preliminarily applied in the analysis of sweet sorghum smut silk gene. The sweet sorghum genome can be extracted with the method of CTAB. [Results] The concentration of Taq polymerase was further optimized through the comparison test of the different concentrations of Taq polymerase. The amplified polymorphism of SSR molecular marker was done by 20 SSR primers and 16 primers were able to clearly amplify the polymorphic bands, which can be used in the initial loci of the resistant gene. Among them, the different band was amplified in 4 primers, which were Xxp279, Xxp284, Xxp36 and Xxp228, respectively. [Conclusion] The optimization of the SSR reaction system was realized based on the comparison of different factors.

Key words Sweet sorghum; SSR; Molecular marker; Head smut

甜高粱又称糖高粱,是普通粒用高粱的一个变种,同样具有抗旱耐涝、耐盐碱、耐瘠薄的特点,它不仅籽粒产量高,而且植株高大、茎叶繁茂,茎秆富含糖分。甜高粱茎秆的含糖量一般可达13%~23%,在10℃以上的积温达2600~4100 h的地区均可栽培^[1]。甜高粱作为糖料、饲用、酒精和造纸的原料作物,其开发效益极为显著。2001年,联合国粮农组织分别在陕西省和山东省设立甜高粱试验基地,扶持甜高粱的开发利用。丝黑穗病 *Sporisorium reilianum* (Khn) Ginton] 是遍布世界的重要高粱病害。病株矮于健株,发病初期病穗穗苞很紧,下部膨大,旗叶直挺,剥开可见内生白色棒状物,即乌米。乌米在发育进程中,内部组织由白变黑,后开裂,乌米从苞叶内外伸,表面被覆的白膜也破裂开,露出黑色丝状物及黑粉,即残存的花序维管束组织和病原菌冬孢子。叶片染病在叶片上形成红紫色条状斑,扩展后呈长梭形条斑,后期条斑中部破裂,病斑上产生黑色孢子堆,孢子量不大。该病在辽宁、吉林、山西发生普遍且严重^[4]。

随着分子生物学技术的迅猛发展,利用SSR、RAPD及RFLP等分子标记技术,对水稻、小麦、玉米等作物的主要农艺性状基因进行识别、定位和分离研究,构建它们的基因图谱,并取得了较大进展。然而,在甜高粱丝黑穗病基因的分子标记研究上,国内仍属空白,国际报道也较少。SSR技术具有很好的稳定性和重复性,便于不同实验室间试验结果的交流和比较。同时,SSR简便快速的分析技术,能在短时间内对大量样品进行分析,具有更强的实用性和更广的应用前景,成为目前分子标记技术的热点。近年来,SSR标记已被广泛应用于基因型鉴定与品种保护、亲缘关系、种质鉴定、QTL分析、分子标记辅助育种等领域,是应用较为广泛的遗

传标记。由于大多数真核生物中均含有丰富而高度多态性的SSR标记,SSR标记技术在许多物种中得到广泛应用。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料。甜高粱抗丝黑穗病品种LTR102,甜高粱感丝黑穗病品种LTR106,均由辽宁省农业科学院提供。

1.1.2 试验器材。SORVALL冰冻离心机,FA1604M电子天平,EC250-90电泳仪,电冰箱EC330,P7021TP-6微波炉,EN61010-1 PCR扩增仪,微量移液器,DYY-10C型电泳仪,B700紫光扫描仪,磁力搅拌器,Milli-Q超纯水仪,恒温振荡器。

1.1.3 试验药品。电极缓冲液,溴酚蓝溶液,溴化乙锭,CTAB缓冲液,TE缓冲液,24-1氯仿/异戊醇,异丙醇,75%乙醇,琼脂糖,Taq酶,dNTP,RAPD随机引物,过硫酸铵,29-1丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺,TEMED,亲合硅烷,剥离硅烷,氨水,硝酸银,氢氧化钠,丙三醇,甲醛,碳酸钠(进口)。

1.2 试验方法

1.2.1 试材培养。用3%的次氯酸钠消毒甜高粱种子6 min,经反复冲洗后放培养皿中吸胀5~6 h。于20℃培养箱中催芽48 h。选取催芽较好的种子播种于塑料烧杯上,实验室培养。待其长至3~4片可见叶,选取每株颖叶进行以下试验。

1.2.2 甜高粱DNA的提取。采用CTAB法提取甜高粱叶片的总DNA。

1.2.3 DNA纯度检测。电泳检测:取3 μ DNA于0.7%琼脂糖凝胶中电泳,电压60 V,电泳40~60 min,于凝胶成像系统440-CF下检测所提取的总DNA的纯度。

1.2.4 Taq酶的优化。在Taq酶的用量分别为0.1、0.5、1.0 μ时,进行SSR扩增。分别在凝胶成像系统440-CF下进行结果对比分析,从而找出最优Taq酶用量用于以下试验。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳时间优化。聚丙烯酰胺凝胶电泳时,分别选用90、105 min进行电泳,分别经染色、显色后在扫描仪下进行结果检测。

基金项目 辽宁省教育厅重点实验室资助项目(20060806)。

作者简介 魏鑫(1985-),女,辽宁沈阳人,硕士研究生,研究方向:植物分子生物学与基因工程。* 通讯作者,yueyinglicn@yahoo.com.cn。

收稿日期 2008-10-07

1.2.6 引物筛选。

1.2.6.1 SSR 反应步骤。取0.2 ml Eppendorf 管,每管按样品编号后加入如下成分:反应体系为20.0 μ l,其中包括 Buffer 2.0 μ l,25 mg/ml MgCl₂ 2.0 μ l,100 μ mol/L dNTP 1.5 μ l,5 U/ μ l Taq 酶0.5 μ l,0.2 μ mol/L 引物1.5 μ l,25 ng/ μ l 模板 DNA 2.0 μ l。加样完毕后,放入 EN61010-1PCR 扩增仪中进行 PCR 反应,反应程序为:94 5 min (94 20 s 54 30 s 72 40 s) 35 个循环 72 10 min 4 保存。

1.2.6.2 凝胶电泳。琼脂糖凝胶电泳。1.4% 琼脂糖凝胶的制备:称取1.4 g 的琼脂糖,加入100 ml 0.5 倍TBE 缓冲液,在P7021TP-6 微波炉中加热煮化,冷却至50 左右时加入5 μ l 溴化乙锭,混匀后倒入胶槽中,倾倒时小心不要出现气泡。反应产物的电泳分离:将 Eppendorf 管取出,每管加入适量的溴酚蓝指示剂,混匀后取3 μ l 点样于1.4% 琼脂糖凝胶孔中,接通电源后将DYY-10C 型电泳仪分别调至70 V 的电压进行电泳。电泳结果观察在凝胶成像系统440-CF 上进行。聚丙烯酰胺凝胶电泳。制板过程:每块板先用蒸馏水擦拭2 遍,再用酒精擦拭2 遍。用擦镜纸在长板上均匀涂抹亲合硅烷、短板上均匀涂抹剥离硅烷。在长板两侧放上胶条后,将短板盖在长板上。将配制好的6% 的胶溶液均匀倒入已经擦拭干净的2 块板的空隙中,注意不要产生气泡,倒好后将梳子的平面插入,使梳子平面在一条水平线上,静置一段时间使胶凝固。电泳过程:向电泳槽的下槽倒入0.5 倍TBE 缓冲液,使缓冲液没过电极线,将上槽胶板依次放入下槽内,固定。拔下梳子,将长板内侧多余的胶除去(此时最好用胶头滴管沿板口向下吹气,以便梳子插入)。使梳子具齿的一端向下,插入胶面内,插入的深浅要适度。插好后进行电泳。预电泳:U=500 V,P=50 W,I=10 A,电泳时间10 min。点样:每种样品5 μ l,Marker 5 μ l。电泳:U=500 V,P=50 W,I=10 A,电泳时间90 min。银染:将板分开,长板置于溶液中进行染色(摇床水浴温度为35)。溶液依次为:蒸馏水3 ~5 min; 0.1% CTAB 20 min; 0.3% 氨水15 ~25 min; AgNO₃ 染色15 min; 蒸馏水2 min; Na₂CO₃+ 甲醛,出带即可; 蒸馏水1 min; 甘油5 ~7 min。扫描:将染色后所出的带进行扫描保存。

2 结果与分析

2.1 甜高粱 DNA 的提取(CTAB) 及检测 将用 CTAB 法提取的 DNA 进行0.7% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像结果如图1。提取出了20 个 DNA 条带,CTAB 方法的提取物中有18 条是一条清晰的条带,基本无降解现象,说明用 CTAB 法提取甜高粱 DNA,可获得质量较高的 DNA,用于分子标记。其余2 条有轻微降解现象,不适用于分子标记。

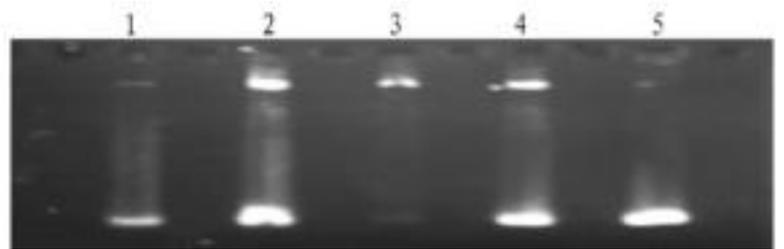


图1 DNA 纯度检测

Fig.1 The detection of DNA purity

2.2 Taq 酶的优化 选用3 种不同用量 Taq 酶进行 SSR 扩增,发现不同用量的 Taq 酶对 SSR 结果影响比较明显。在

Taq 酶用量为0.1 μ l 的扩增体系中发现,第1 条谱带不是很清晰,分析认为是酶用量过小。在 Taq 酶用量为1.0 μ l 时的扩增体系中发现,第2 条谱带不是很清晰,分析认为,是酶用量不适宜。在 Taq 酶用量为0.5 μ l 时的扩增体系中发现,有2 条明显的谱带,说明该用量为最适用量(图2)。



注:0.1 μ l(1 和5),1.0 μ l(3),0.5 μ l(2 和4)。

Note :1 and 5,0.1 μ l;3,1.0 μ l;2 and 4,0.5 μ l.

图2 Taq 酶的优化结果

Fig.2 The optimization results of Taq polymerase

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳时间优化 将用琼脂糖检测后的 SSR 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,时间分别设定为90 (图3) 和105 min(图4)。试验结果显示,电泳时间过长,谱带跑得过于分散,显像的效果不好并且条带不明显,不易分析。因此,在聚丙烯酰胺凝胶电泳过程中应选用90 min。



图3 电泳时间为90 min

Fig.3 Electrophoresis with the time of 90 min



图4 电泳时间为105 min

Fig.4 Electrophoresis with the time of 105 min

2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果 对 SSR 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,结果显示,16 个引物扩增出了条带(图5),在这16 个引物之中有4 个引物扩增出了差异性谱带(表1)。

表1 差异带的比较分析

Table 1 The comparative analysis of difference bands

引物 Primer	条带数 Band number	与 Marker 比较 bp Compared with Marker	模板 Template
Xxp279	1	300	甜高粱抗丝黑穗病品种的 DNA
Xxp279	3	350	甜高粱感丝黑穗病品种的 DNA
Xxp284	1	280 ~210	甜高粱抗丝黑穗病品种的 DNA
Xxp284	1	400 ~280	甜高粱感丝黑穗病品种的 DNA
Xxp36	1	90	甜高粱抗丝黑穗病品种的 DNA
Xxp36	1	200	甜高粱感丝黑穗病品种的 DNA
Xxp228	1	210	甜高粱抗丝黑穗病品种的 DNA
Xxp228	1	280	甜高粱感丝黑穗病品种的 DNA

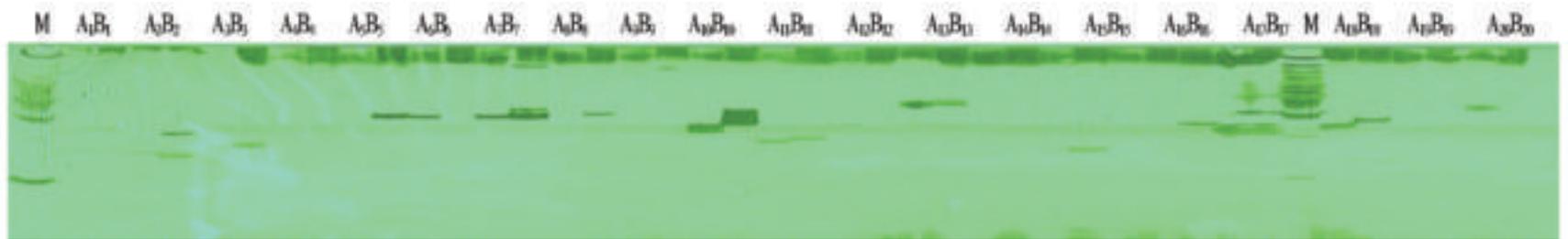
3 结论

3.1 Taq 酶的优化 目前,用于 PCR 的耐热 DNA 聚合酶有很多种,其中最常用的是 Taq DNA 聚合酶,它在 PCR 反应中起着关键的作用。若酶量过少会影响靶序列扩增产量,过多则会导致非特异性的扩增。在该试验中所选用的0.1、0.5、

1.0 μ 的 Taq 酶用量中,0.5 μ 最为合适。

3.2 SSR 电泳的检测条件优化 在 SSR 电泳检测的方法中,最常见的是琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测出的图像更为清晰,检测出的谱带更

多。在该试验中,对凝胶电泳进行了时间的优化,30 min 为琼脂糖凝胶电泳的最佳时间,90 min 为聚丙烯酰胺凝胶电泳的最佳时间。



注: Xxp317(A₁B₁), Xxp262(A₂B₂), Xxp43(A₃B₃), Xxp141(A₄B₄), Xxp45(A₅B₅), Xxp47(A₆B₆), Xxp279(A₇B₇), Xxp250(A₈B₈), Xxp40(A₉B₉), Xxp284(A₁₀B₁₀), Xxp36(A₁₁B₁₁), Xxp31(A₁₂B₁₂), Xxp56(A₁₃B₁₃), Xxp312(A₁₄B₁₄), Xxp96(A₁₅B₁₅), Xxp230(A₁₆B₁₆), Xxp145(A₁₇B₁₇), Xxp228(A₁₈B₁₈), Xxp1(A₁₉B₁₉), Xxp284(A₂₀B₂₀)。

图5 SSR 扩增结果

Fig.5 The results of SSR amplification

3.3 甜高粱丝黑穗病 SSR 扩增的结果 该试验甜高粱丝黑穗病基因的分析中选用了 20 个随机引物,在琼脂糖凝胶电泳检测下,以甜高粱丝黑穗病父本的 DNA 为模板,有 13 个引物扩增出了谱带。以甜高粱丝黑穗病母本的 DNA 为模板,有 18 个引物扩增出了谱带。在聚丙烯酰胺凝胶电泳检测下,以甜高粱丝黑穗病亲本的 DNA 为模板,有 16 个扩增出谱带,其中有 4 个引物扩增出了差异性谱带,分别为 Xxp279、Xxp284、Xxp36、Xxp228。根据差异谱带的不同,可以分析出其碱基序列的不同,从而筛选出抗性个体的遗传学特征,对其进行农业生产培育出优良的甜高粱品种,提高甜高粱品种对丝黑穗病的抗性。

参考文献

- [1] 王建伟. 甜高粱的综合开发和利用[J]. 农村科技,2007(7):86.
- [2] 刘明慧,王钊,王西红. 甜高粱的综合利用与开发[J]. 山西农业,2007(2):51.
- [3] 黎大爵,朱翠云,宋仁本,等. 甜高粱及其利用[M]. 北京:科学出版社,1992:20-22.
- [4] 董良利,赵威军. 高粱丝黑穗病研究综述[J]. 山西农业科学,2006,34(2):82-85.

(上接第15793页)

- [11] 张爱民,罗铮,刘冬成,等. 我国部分优质小麦品种遗传差异的SSR标记分析[J]. 麦类作物学报,2004,24(1):1-5.
- [12] 高睦枪,刘冬成,郭小丽. 我国冬小麦新品种(系)SSR遗传差异研究[J]. 农业生物技术学报,2001,9(1):49-54.
- [13] PLASCHKE J, GANAL M W, RÖDER M S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers[J]. Theor Appl Genet, 1995,91:1001-1007.
- [14] 马渐新,董玉琛. 用微卫星标记定位一个未知的小麦抗条锈病基因[J]. 科学通报,1999,44(14):1513-1517.
- [15] SHI Z X, IINE R F. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the Yr9 gene resistance to wheat stripe rust[J]. Genome, 2001,44:509-516.
- [16] HELGUERA M, DUBCOVSKY J. Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene Lr47[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000,100:1137-1143.
- [17] SEYFARTH R, SCHACHERMAYR G. Molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene Lr13 in wheat (*Triticum aestivum*L.) [J]. Journal of Genetics and Breeding, 2000,54:193-198.
- [18] CADALENT, CHARMET G. Molecular markers linked to genes affecting plant height in wheat using a doubled-haploid population[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998,96:933-940.
- [19] 索广力,何聪芬. 利用RAPD—BSA技术筛选小麦耐盐突变位点的分子标记[J]. 植物学报,2001,43:599-602.
- [20] NEMOTO Y, SASAKUMA T. Isolation of novel early salt-responder genes from wheat (*Triticum aestivum*L.) by differential display[J]. Theoretical and

- [5] 管敏强,陈锡文,赵惠玲. 分子标记技术及其应用[J]. 实验动物科学与管理,2005,22(1):48-50.
- [6] 陆德如,陈永青. 现代生物技术丛书——基因工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003:27-30.
- [7] J·M·沃克,R·拉普勒. 分子生物学与生物技术[M]. 谭天伟,黄留玉,苏国富,等. 译. 北京:化学工业出版社,2003:29-31.
- [8] 邹喻苹. RAPD分子标记简介[J]. 生物多样性,1995,3(2):104-108.
- [9] 李癯莹. DNA体外扩增技术——聚合酶链式反应(PCR)[J]. PCR技术原理,2000,18(4):40-41.
- [10] 赵亚力,马学斌,韩为东. 分子生物学基本试验技术[M]. 北京:清华大学出版社,2006:91-92.
- [11] GONG L, SIFT G, KOFLER R, et al. SSR markers for the genus *Cucurbita* [J]. Proceedings of the 2nd International Conference on Plant Molecular Breeding, 2007,55:23-27.
- [12] 郑景生,陈良兵,符文英,等. 野生稻不同基因组的SSR多样性分析[J]. 分子植物育种,2004,2(1):25-33.
- [13] 马骥超,常滔,姜俊龙,等. SSR标记在小麦抗病QIL及抗病基因定位中的应用[J]. 中国植保导刊,2007,27(6):11-15.
- [14] YUJ F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Tacli derms fasciatus heckel* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(5):37-39,95.
- [15] 张海泉. 粗山羊草Y189抗小麦白粉病基因SSR标记[J]. 河南大学学报:自然科学版,2007,37(2):177-180.

Applied Genetics, 1999,98:673-678.

- [21] 关荣霞,郭小丽,刘冬成,等. 小麦T型细胞质雄性不育恢复基因R6的ISSR标记分析[J]. 中国农业科学,2002(11):1297-1301.
- [22] 刘保申,孙其信,高庆荣,等. K型小麦细胞质雄性不育系育性恢复基因的SSR分子标记分析[J]. 中国农业科学,2002(4):354-358.
- [23] 石运庆,牟秋焕,李鹏,等. V型小麦细胞质雄性不育系育性恢复基因的SSR分子标记分析[J]. 山东农业科学,2005(3):3-5.
- [24] 刘立科,侯宁,刘建成,等. 小麦D2型细胞质雄性不育恢复基因近等基因系筛选和遗传背景分子检测[J]. 麦类作物学报,2006(5):1-4,15.
- [25] FAHMA T, RÖDER M S, GRAMA A, et al. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust [J]. Theor Appl Genet, 1998,96:187-195.
- [26] BRYAN G J, STEPHENSON P, STEPHENSON P. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997,94:557-563.
- [27] 薛庆中,张能义,熊兆飞,等. 应用分子标记辅助选择培育抗白叶枯病水稻恢复系[J]. 浙江农业大学学报,1998,24(6):631-638.
- [28] 王小国,李英枫,梁红艳,等. SSR分子标记技术在小麦遗传多样性研究中的应用[J]. 江西农业学报,2007,19(7):15-17.
- [29] YUJ F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Tacli derms fasciatus heckel* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(5):37-39,95.
- [30] 王长有,吉万全,王秋英,等. SSR标记在小麦遗传育种中的应用研究进展[J]. 麦类作物学报,2004,24(1):70-74.