

高粱 DNA 的提取纯化及抗丝黑穗病基因的初步分析

李玥莹, 彭霞, 倪娜, 陶思源 (沈阳师范大学化学与生命科学学院, 辽宁沈阳 110034)

摘要 [目的] 为快速选育抗病高粱新品种提供理论依据。[方法] 采用 CTAB 法提取高粱基因组 DNA, 运用 RAPD 分子标记技术对高粱的抗丝黑穗病基因进行初步分析。[结果] 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 采用 CTAB 法提取高粱叶片 DNA 有较好的提取效果。通过对 70 个随机引物进行筛选, 获得了 34 个具有多态性扩增谱带的 RAPD 引物, 确定为适宜引物。34 个适宜引物共扩增出 107 条谱带, 平均每个引物扩增出 3.1 条谱带, 使高粱基因组呈现出 1 种多态性。[结论] 高粱抗丝黑穗病基因的 RAPD 扩增谱带集中分布在 600~3 000 bp。

关键词 高粱; 丝黑穗病; CTAB 法; RAPD 分子标记

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)05-01776-02

Extraction and Purification of Sorghum DNA and Preliminary Analysis of Head Smut Resistance gene on in Sorghum by RAPD Marker

LI Yue-ying et al (Collage Chemistry and Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034)

Abstract [Objective] The research aimed to provide theoretical basis for breeding new sorghum varieties with disease resistance rapidly. [Method] Genomic DNA was extracted from sorghum by using CATB method and head smut resistance gene in sorghum was preliminarily analyzed by using RAPD molecular marker technology. [Result] The results of detection by agarose gel electrophoresis indicated that extracting DNA from the leaves of sorghum by CATB method had better extraction effects. Thirty-four RAPD primers with polymorphic amplified bands were obtained through screening 70 random primers, which were confirmed as suitable primers. One hundred and seven bands were amplified by 34 suitable primers. Each primer amplified 3.1 bands averagely, which made the genome of sorghum show a kind of polymorphism. [Conclusion] RAPD amplified bands of head smut resistance gene in sorghum were concentrated in 600~3 000 bp.

Key words Sorghum; Head Smut; CTAB method; RAPD molecular marker

丝黑穗病是遍布全世界的重要高粱病害, 在我国各高粱产区均有发生, 以东北和华北地区危害最严重, 是影响我国高粱生产发展的主要病害之一^[1]。利用 DNA 分子标记的方法通过找到抗性品种和感性品种之间高粱丝黑穗病的差异, 进行抗病基因精确定位, 有助于分子标记辅助育种, 从而选育抗病品种, 从根本上防治高粱丝黑穗病。与常规育种相比, 其具有节约时间、节省资金、缩短育种周期等优点, 同时可以避免化学农药引起的环境污染和生态平衡破坏。为此, 笔者选用 RAPD 技术对高粱抗丝黑穗病基因进行标记, 旨在为快速选育抗病新品种、节省育种时间奠定基础^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料 高粱试材分别为: 622B(感丝黑穗病)与 7050B(抗丝黑穗病)杂交 F₂ 代中的感性个体以及 3073(抗丝黑穗病)和 3049(感丝黑穗病), 所用的高粱品种由辽宁省农业科学院作物研究所提供。

Milli-Q 超纯水仪; FA1604N 电子天平; MDF-382E 电冰箱; BCD-218 电冰箱; SORVALL 冰冻离心机; P7021tp-6 微波炉; AF100 制冰机; 水浴锅; EC250-90 电泳仪; EN 61010-1 PCR 扩增仪; 微量移液器; 85-1 恒温磁力搅拌器; 多功能凝胶成像系统 440-CF; 计算机。

TBE 电极缓冲液, 溴酚蓝溶液, 溴化乙锭(EB), CTAB 缓冲液, TE 缓冲液, 氯仿/异戊醇, 异丙醇, 浓度 75%乙醇, 琼脂糖, 蒸馏水, 超纯水; 引物, 酶, dNTP, 均由上海生工生物技术公司提供。

1.2 方法 试验主要技术路线为: 基因组 DNA 的提取(CTAB 法)→RAPD 扩增→琼脂糖电泳→电泳谱带分析→数据处

理分析。

1.2.1 前处理。将种子吸胀 24 h 后, 于 20℃恒温箱中催芽 48 h, 选取催芽较好的种子播种于花盆中, 实验室培养, 待其长至 3~4 片可见叶时, 选取每株颖叶进行试验。

1.2.2 植物 DNA 的提取。取 1 g 鲜叶于瓷研钵中, 加液氮研磨成粉末, 转入 5 ml 离心管中, 分别按照下述 CTAB 方法进行提取和纯化。①在 5 ml 离心管中加入 0.5 ml 2% 的 CTAB, 马上封盖, 贴标签, 放入水浴锅中, 60~65℃恒温保温 90 min。②将上述离心管取出, 加入等体积的氯仿: 异戊醇=24:1(V:V), 摇匀, 摇时(带手套)不宜用力过猛, 摇大约 30~40 次。③在 9 000~10 000 r/min 的 SORVALL 冷冻离心机上离心 10 min; 取上清液, 加等体积的氯仿: 异戊醇=24:1, 振荡, 10 000 r/min 离心 5 min; 取上清液, 加等体积的氯仿: 异戊醇=24:1, 振荡, 10 000 r/min 离心 5 min。④取上清液, 加入 0.6~0.7 倍体积的异丙醇, 室内沉淀 30 min。⑤10 000 r/min 离心, 去上清液, 取沉淀, 沉淀用浓度 75%乙醇冲洗 1~2 次, 轻摇再离心, 之后倒掉乙醇, 留下沉淀, 在 37℃恒温箱中干燥 2 h。

1.2.3 DNA 纯度的电泳检测。将干燥后的 DNA 溶于 100 μl TE 溶液中, 吸取 5 μl, 经 0.7%琼脂糖胶走电泳。电压 80 V, 电泳时间 80~90 min, 于凝胶成像系统 440-CF 下检测 DNA 的降解情况。

1.2.4 RAPD 反应步骤。

(1)加样。取 0.2 ml Eppendorf 管, 每管按样品编号后加入如下成分: 反应体系共 25 μl, 其中 18 μl dd H₂O, 0.5 μl 100 μmol/L dNTP, 2.5 μl 10×buffer, 0.5 μl 5 U/μl Taq 酶, 1.0 μl 0.2 μmol/L 引物, 1.0 μl 25 ng/μl 模板, 2.5 μl 25 mg/ml MgCl₂。

(2)PCR 反应。在 EN61010-1PCR 扩增仪中进行 PCR 反应, 反应程序为: 94℃ 3 min 预变性→94℃ 30 s 变性, 72℃

基金项目 沈阳市科技局国际合作项目(10410530517-6-04); 辽宁省教育厅重点实验室项目(编号: 20060806)。

作者简介 李玥莹(1966-), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 教授, 从事生物技术教学及研究工作。

收稿日期 2007-10-25

80 s 延伸, 38 °C 20 s 退火, 35 个循环 → 72 °C 10 s 延伸 → 4 °C 保存。

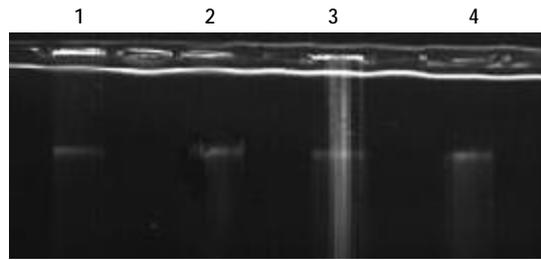
(3) 反应产物的电泳分离。将 Eppendorf 管取出, 每管加入 3 μl 的溴酚蓝指示剂, 混匀后取 4 μl 点样于 1.4 % 琼脂糖凝胶孔中, 接通电源后将 DYY-10C 型电泳仪的电压调至 80 V。

(4) 1.4 % 琼脂糖凝胶的制备。称取 1.4 g 琼脂糖, 加入 100 ml 0.5 % TBE 缓冲液, 在微波炉上加热煮化, 冷却至 50 °C 左右时加入 5 μl 溴化乙锭(溴化乙锭是强诱变剂并有中等毒性, 配制和使用时应都戴手套), 混匀后倒入胶槽中, 倾倒时小心不要出现气泡。

(5) 电泳结果观察。在凝胶成像系统 440-CF 上进行。

2 结果与分析

2.1 CTAB 方法提取所得 DNA 纯度的电泳检测结果 CTAB 方法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱见图 1。由图 1 可知, CTAB 方法提取的提取物均是一条清晰的条带, 基本无降解现象。因此, 在高粱叶片 DNA 的提取过程中选用 CTAB 方法较合适。

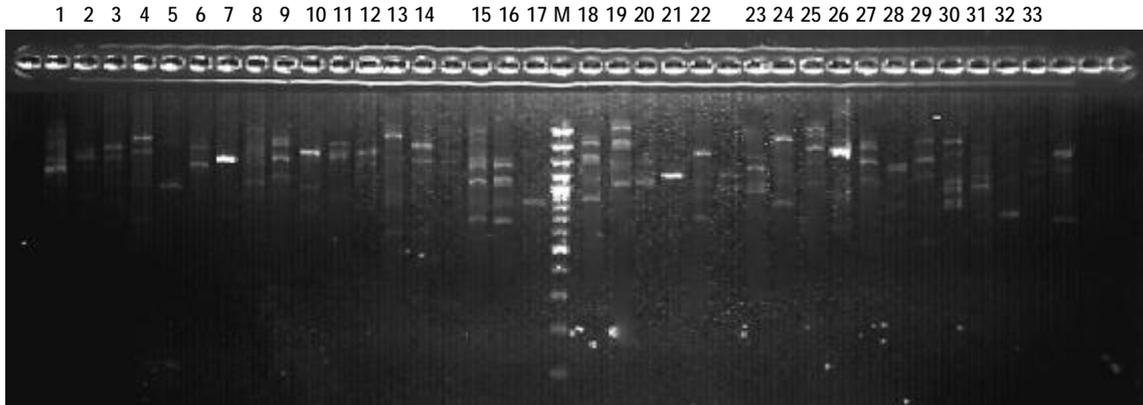


注: 1 为 3073; 2 为 8113; 3 为 8101; 4 为 3049。
Note: 1: 3073; 2: 8113; 3: 8101; 4: 3094.

图 1 DNA 凝胶检测结果

Fig.1 Result of DNA gel detection

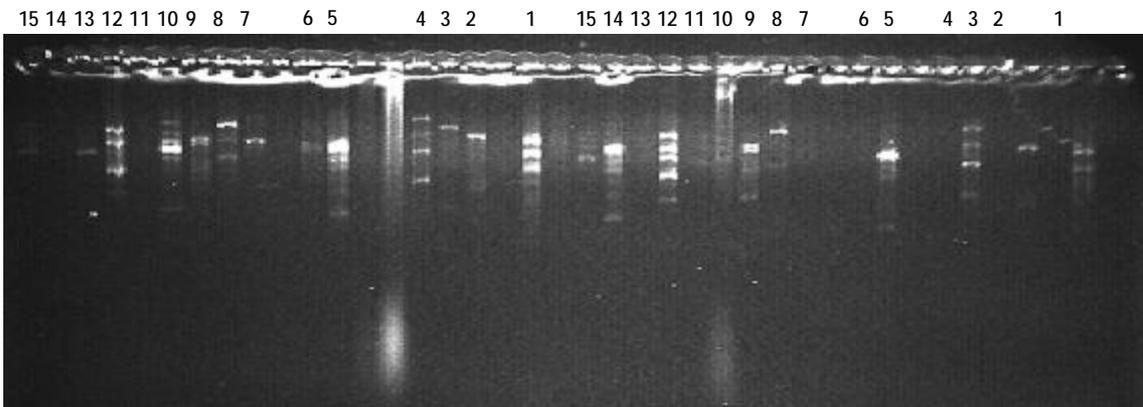
2.2 RAPD 引物的筛选结果 选用的 70 个随机引物, 其中有 34 个引物扩增出清晰的谱带, 说明这 34 个引物为适宜引物, 分别为: S-76, S-66, S-73, S-77, S-28, S-59, S-78, S-68, S-57, S-79, S-74, S-62, S-67, S-63, S-70, S-47, S-48, S-61, S-53, S-56, S-84, S-75, S-71, S-65, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7, S-9, S-14, S-16, S-17, S-18。RAPD 反应扩增的谱带在 600~3 000 bp, 34 个适宜引物共扩增出 107 条谱带, 平均每个引物扩增出 3.1



注: 1 为 S-76, 2 为 S-66, 3 为 S-73, 4 为 S-77, 5 为 S-28, 6 为 S-59, 7 为 S-78, 8 为 S-68, 9 为 S-57, 10 为 S-79, 11 为 S-74, 12 为 S-62, 13 为 S-67, 14 为 S-63, 15 为 S-70, 16 为 S-47, 17 为 S-48, 18 为 S-61, 19 为 S-53, 20 为 S-56, 21 为 S-84, 22 为 S-75, 23 为 S-71, 24 为 S-65, 25 为 S-3, 26 为 S-4, 27 为 S-5, 28 为 S-6, 29 为 S-7, 30 为 S-9, 31 为 S-14, 32 为 S-16, 33 为 S-17, 34 为 S-18。
Note: 1: S-76, 2: S-66, 3: S-73, 4: S-77, 5: S-28, 6: S-59, 7: S-78, 8: S-68, 9: S-57, 10: S-79, 11: S-74, 12: S-62, 13: S-67, 14: S-63, 15: S-70, 16: S-47, 17: S-48, 18: S-61, 19: S-53, 20: S-56, 21: S-84, 22: S-75, 23: S-71, 24: S-65, 25: S-3, 26: S-4, 27: S-5, 28: S-6, 29: S-7, 30: S-9, 31: S-14, 32: S-16, 33: S-17, 34: S-18.

图 2 F₂ 代中感性个体 DNA 的 RAPD 扩增反应结果

Fig. 2 Result of RAPD amplification of susceptible individual DNA in F₂



注: 左侧 1~15 为 3049(感丝黑穗病); 右侧 1~15 为 3073(抗丝黑穗病); 1 为 S-78, 2 为 S-76, 3 为 S-75, 4 为 S-74, 5 为 S-71, 6 为 S-70, 7 为 S-68, 8 为 S-67, 9 为 S-66, 10 为 S-65, 11 为 S-63, 12 为 S-62, 13 为 S-61, 14 为 S-57, 15 为 S-56。
Note: Left 1~15: 3049 (infected by head smut); Right 1~15: 3073 (resistance to head smut); 1: S-78, 2: S-76, 3: S-75, 4: S-74, 5: S-71, 6: S-70, 7: S-68, 8: S-67, 9: S-66, 10: S-65, 11: S-63, 12: S-62, 13: S-61, 14: S-57, 15: S-56.

图 3 感性和抗性高粱品种 DNA 的 RAPD 扩增反应结果

Fig. 3 Result of RAPD amplification of sorghum DNA of susceptible and resistant varieties

乡土建筑,传统风貌逐渐消失,现代、后现代建筑的大量引入,使得整个景观失去和谐,互不相融。新建村落平庸无味,千村一面,结果是乡村景观彻底破坏,失去了旅游特色。

4.3 乡土民族文化失传,外来文化入侵 乡村景观中的人文景观,是有不同地区的非物质文化遗产为特征、以文化物证表达的景观。总的来说是人们在生活中所积累下来的地区或者民俗的习惯,是某一个地区或某些群体的思想的反映。随着旅游地开展,大量游客的涌入,他们在接受新思想、新文化的同时也在不断地改变着自己的这些生活方式和习惯。这些非物质文化遗产,是经过千百年积淀保留下来的,外来文化的侵蚀,会导致乡土文化的遗失,旅游吸引力的下降。

4.4 环境卫生条件差,生态问题突出 随着乡村旅游活动的开展,生活垃圾、污水、固体废气物不断的增多,垃圾的随意堆积(图 1),使乡村承受越来越多的环境卫生压力,这必然使原有的水质、动植物等受到影响,导致生态问题加剧。



图 1 生活垃圾的燃烧

旅游者到乡村旅游不仅是为了领略青山秀水的自然风光和民族文化,更是为了享受乡村天人合一的居住环境和那份清新、宁静与惬意。低劣的卫生条件、生态破坏势必影响旅游者的旅游感受。

5 建议

乡村景观旅游开发的最终目标是达到指社区居民、旅游者,生态环境的共同和谐,物质和非物质文化遗产的共同繁荣。因此笔者建议不能盲目发展乡村景观,而应有目标有计划地合理开发规划,具体应做到以下几个方面:①保持原有的居民建筑特色、布局方式;②充分突出乡土特色,挖掘具有强烈乡土特色的地方娱乐、生活习俗、民间工艺和民俗节庆活动;③注重乡村生态环境保护,通过多种渠道启发人们爱护自然、保护生态环境;④尊重社区居民的感受和意愿,增强他们的自豪感和对乡村文化、自然环境的继承发扬的意识;⑤加强乡村景观的监督管理,对影响乡村景观风貌的违章行为和建设应加以制止,对于建成的乡村景观要进行必要的维护与管理,保持良好的乡村田园景观风貌。

参考文献

- [1] 梅燕.论现代乡村景观旅游开发[J].农村经济,2003(10):53-54.
- [2] 沈国斐.关于乡村旅游发展的探讨[J].生态经济,2005(12):95-98.
- [3] 郑群明,钟林生.参与式乡村旅游开发模式探讨[J].旅游学刊,2004,19(4):33-37.
- [4] 栗维斌,陈尚玲.龙胜县乡村旅游发展中存在的问题对策[J].桂林旅游高等专科学校学报,2005,16(3):36-38.
- [5] 郭焕成.中国旅游发展笔谈——如何发展中国特色的乡村旅游(一):发展乡村旅游业,支援新农村建设[J].旅游学刊,2006,21(3):6-7.
- [6] 冯淑华.乡村景观旅游开发[J].国土与自然资源研究,2005(1):69-70.
- [7] 王云才.现代乡村景观旅游规划设计[M].青岛:青岛出版社,2003.

(上接第 1777 页)

条谱带,使高粱基因组呈现出一种多态性(图 2、3)。

3 结论与讨论

该试验结果表明,CTAB 法适宜提取高粱 DNA。在该试验所用的 70 个随机引物中,有 34 个引物能扩增出清晰的条带,为适宜引物,其余 36 个引物没有扩增出谱带,则不适宜,被淘汰掉。RAPD 反应扩增的谱带分子量一般在 600~

3 000 bp。34 个适宜引物共扩增出 107 条谱带,平均每个引物扩增出 3.1 条谱带,使高粱基因组呈现出一种多态性。

参考文献

- [1] 姜玲.RFLP 和 RAPD 技术及其在园艺植物上的研究和应用[J].生物技术,1996,6(6):35-39.
- [2] 卢江.随机放大多态性 DNA(RAPD)——一种新的遗传分析手段[J].植物学报,1993,35(S):119-127.