

RAPD 分子标记技术在甜高粱基因组研究中的应用

李南珠, 李震莹*

(1. 沈阳师范大学化学与生命科学学院, 辽宁沈阳110034; 2. 沈阳市中医药学校, 辽宁沈阳110300)

摘要 [目的] 应用 RAPD 技术对甜高粱丝黑穗病基因进行分子标记研究。[方法] 以抗病亲本 7050B 与感病亲本 TX622B 杂交后的 F₂ 代以及抗病甜高粱品种 8113 和感病甜高粱品种 8101 为试材, 用 CTAB 法提取 DNA, 用 RAPD 分子标记技术对其 DNA 进行多态性扩增与初步分析, 同时对琼脂糖凝胶电泳检测体系进行优化。[结果] CTAB 法适宜提取 DNA。在对抗病亲本 7050B 与感病亲本 TX622B 杂交后的 F₂ 代进行 RAPD 标记时, 用 60 个引物进行筛选, 其中 27 个引物扩增出了多态性谱带; 应用 20 个具有多态性扩增谱带的引物对抗病甜高粱品种 8113 和感病甜高粱品种 8101 进行 RAPD 分析时, 共有 7 个引物扩增出了差异谱带, 分别为 S56、S66、S67、S70、S72、S75、S78。[结论] 该研究为甜高粱优良品种的培育提供科学基础。

关键词 甜高粱; 丝黑穗病; CTAB 法; RAPD 分子标记

中图分类号 S514 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06881-03

Application of RAPD Molecular Marker Technology in Studying Sweet Sorghum Genome

LI Nan-zhu et al (College of Chemistry and Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034)

Abstract [Objective] The study aimed to research the molecular marker of head smut gene of sweet sorghum by RAPD technology. [Method] With the F₂ from cross between the resistant parent 7050B and the susceptible parent TX622B and the sweet sorghum resistant variety 8113 and susceptible variety 8101 as the tested materials, their DNAs were extracted by CTAB method. RAPD molecular marker technology was used to make the polymorphism amplification and preliminary analysis on their DNA and the detection system of agarose gel electrophoresis were also optimized. [Result] CTAB method was suitable to extract DNA. When F₂ from cross between the resistant parent 7050B and the susceptible parent TX622B was made for RAPD molecular marker, 60 random primers were used to screen and 27 primers amplified out the polymorphism bands. When 20 primers with polymorphism amplification bands were used to make the RAPD analysis on the sweet sorghum resistant variety 8113 and susceptible variety 8101, there were 7 primers that amplified out the difference bands, being S56, S66, S67, S70, S72, S75 and S78 resp. [Conclusion] This study provided the scientific foundation for breeding of good varieties of sweet sorghum.

Key words Sweet sorghum; Head smut; CTAB method; RAPD molecular marker

甜高粱亦称糖高粱, 是普通粒用高粱的一个变种, 由于其茎秆富含糖分(17%~24%), 故而得名。甜高粱的用途广泛, 可作为糖料、饲料和能源作物, 甜高粱适应性强、抗旱、耐涝、耐盐碱, 对土壤肥力要求不高, 生长迅速, 糖分积累快, 生物学产量高, 因而引起许多国家的广泛重视, 并积极研究和大力推广。随着石油、煤炭等化石能源日渐耗竭和生态环境恶化, 能源安全和环境安全已成为全世界面临的严峻挑战。开发利用新型可再生能源对于社会、经济的可持续发展具有重要战略意义^[1-2]。我国是能源消费大国, 大力发展能量密度高、抗逆性强、“不与粮争地, 不与人争粮”的生物能源作物可拓展农业结构、促进区域经济发展, 缓解能源供应紧张局面, 减少温室气体排放、改善生态环境, 是保障国家能源安全和环境安全的双赢举措^[1,3-4]。与其他能源作物(如木薯、甜菜等)相比, 甜高粱具有生物产量高(属 C₄ 植物)、含糖量高、多重抗逆性和乙醇转化率高、成本低等优点, 被誉为“高效太阳能转化器”、作物中的“骆驼”^[5]。一般产量可达 4 500~6 000 kg/hm² 和 60 t/hm² 以上茎秆^[1], 单位土地面积的乙醇产量是玉米的 2~3 倍^[5-6]。2007 年 6 月, 以玉米为主的粮食燃料乙醇项目被国家叫停后, 甜高粱作为“生物能源系统中的最有竞争力者”^[3,7-8], 成为我国最具发展前景的绿色能源作物之一。

随着分子生物学技术的迅猛发展, 为植物抗病虫害的研究开辟了新天地, 目前许多科研单位和大专院校正集中力量, 利用 RFLP、RAPD 及 AFLP 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, 并取得了较大的进展^[9-12]。笔者应用 RAPD 技术对甜高粱丝黑穗病基因进行分子标记研究, 为甜高粱优良品种的培育提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。甜高粱 8113(抗丝黑穗病品种)、甜高粱 8101(感丝黑穗病品种), 由辽宁省农业科学院提供。

1.1.2 主要器材。Mili-Q 超纯水仪; FA1604N 电子天平; MDF382E 电冰箱; BCD218 电冰箱; SORVALL 冰冻离心机; P7021tp6 微波炉; AF100 制冰机; 水浴锅; EC250-90 电泳仪; EN61010-1 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。

1.1.3 试验药品。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, 75% 乙醇, 琼脂糖, 蒸馏水, 超纯水, 引物(见附录 1), Taq 酶, dNIP 由上海生工生物技术公司提供。

1.2 方法

1.2.1 试材培养。用 3% 的次氯酸钠消毒 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中, 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。DNA 提取纯化应用 CTAB 法^[13]。

1.2.3 DNA 纯度检测。取 5 μl DNA 于 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压 80 V, 电泳 50~60 min, 于凝胶成像系统 440-CF 下检测 DNA 的谱带情况。

1.2.4 引物筛选。

1.2.4.1 PCR-RAPD 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 25 μl, 其中包括超纯水 17 μl, 100 μmol/L dNIP 0.5 μl, Buffer 2.5 μl, 5 μl Taq

基金项目 辽宁省教育厅重点实验室资助项目(20060806); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-011-03)。

作者简介 李南珠(1962-), 女, 浙江缙云人, 高级讲师, 从事教学及科研工作。* 通讯作者。

收稿日期 2009-02-16

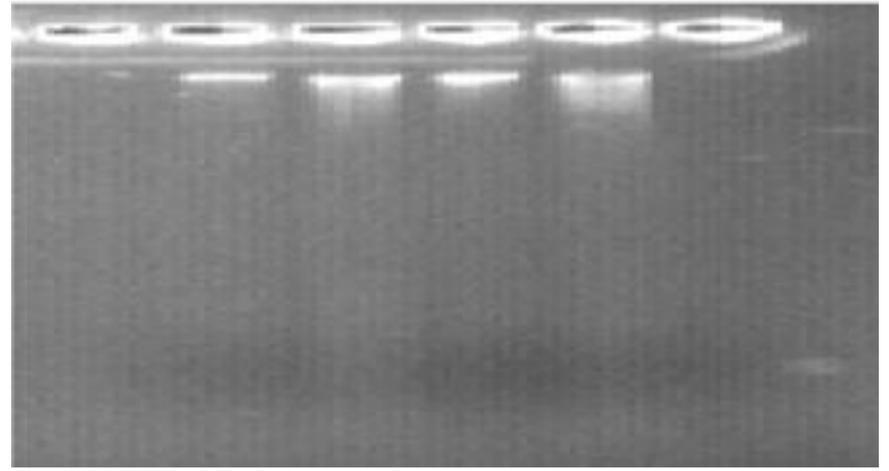
酶 $0.5 \mu\text{l}$, $0.2 \mu\text{mol/L}$ 引物 $1.0 \mu\text{l}$, $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 模版 $1.0 \mu\text{l}$ 。加样完毕后,放入 EN61010-1PCR 扩增仪中进行 PCR 反应,反应程序为: $94 \quad 3 \text{ min}$ ($94 \quad 30 \text{ s}$ $72 \quad 80 \text{ s}$ $38 \quad 20 \text{ s}$) 35 个循环 $72 \quad 10 \text{ min}$ $4 \quad$ 保存。

1.2.4.2 琼脂糖电泳。 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 $3 \mu\text{l}$ 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 80 V 的电压进行电泳。 1.4% 琼脂糖凝胶的制备。称取 1.4 g 的琼脂糖,加入 100 ml TE 缓冲液,在电子万用炉上加热煮化,冷却至 $50 \quad$ 左右时加入 $5 \mu\text{l}$ 溴化乙锭,混匀后倒入胶槽中,倾倒时小心不要出现气泡。电泳结果观察在凝胶成像系统 440-CF 上进行。

1.2.5 甜高粱 DNA 的 PCR-RAPD 基因组分析。 选用具有多态性扩增的 RAPD 引物分别对甜高粱 8113(抗亲)、甜高粱 8101(感亲)的 DNA 进行 RAPD 分析。

2 结果与分析

2.1 用 CTAB 法提取出 DNA 纯度检测 用 CTAB 法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱如图 1 所示,CTAB 方法的提取物均是一条清晰的条带,基本无降解现象。



注:甜高粱黑穗病 8113 (抗亲) 的 DNA(1,2);甜高粱黑穗病 8101 (感亲) 的 DNA(3,4)。

Note :1 and 2 ,DNA from sweet sorghum resistant variety 8113 ;3 and 4 , DNA from sweet sorghum susceptible variety 8101 .

图 1 DNA 琼脂糖凝胶检测

Fig.1 The agarose gel detection of DNA

2.2 检测体系的优化

2.2.1 电压优化。 分别在电压为 60 、 80 、 100 V 下进行电泳,结果表明(图 2~4),在相同电泳时间内, 60 V 的检测效果最佳,因此试验过程中选用 60 V 为检测电压。

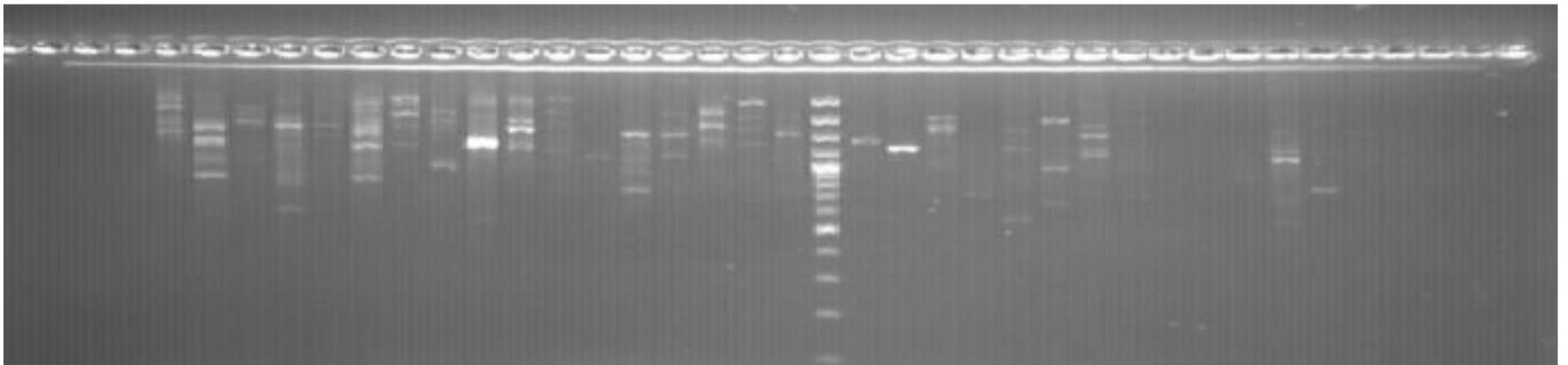


图 2 电压为 60 V 的 RAPD 扩增结果

Fig.2 RAPD amplification results at the voltage of 60 V

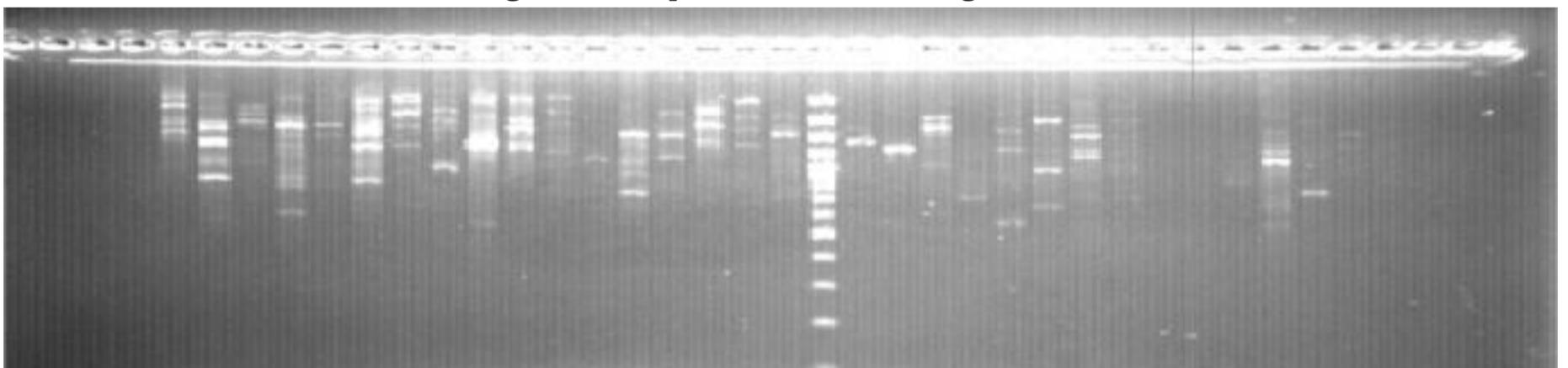


图 3 电压为 80 V 的 RAPD 扩增结果

Fig.3 RAPD amplification results at the voltage of 80 V

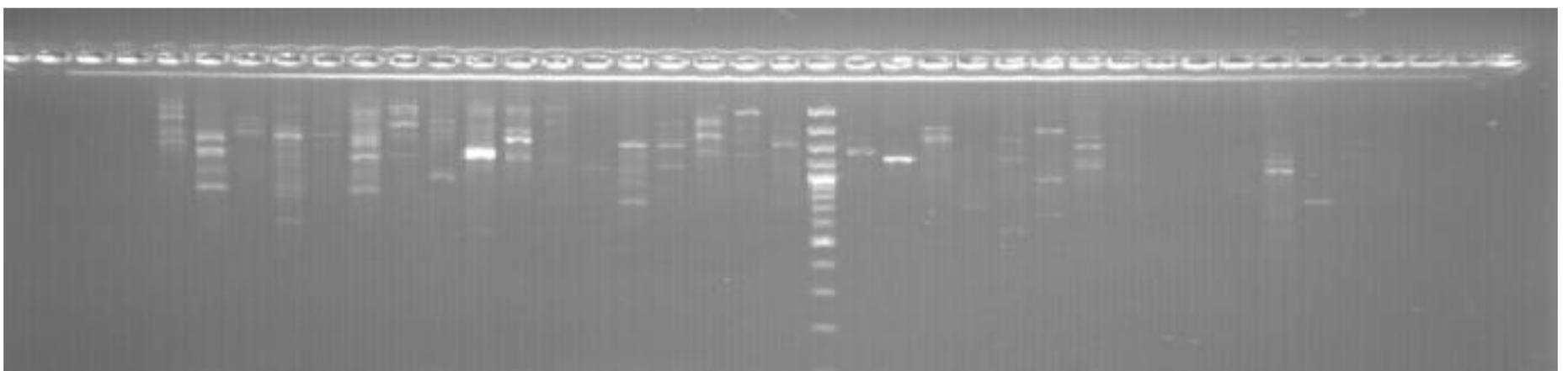


图 4 电压为 100 V 的 RAPD 扩增结果

Fig.4 RAPD amplification results at the voltage of 100 V

2.2.2 点样量的优化。点样分别为3、4、5 μ ，结果显示(图 的谱带最适(图7)。
5) 3 μ 的谱带有点暗;5 μ 的谱带过亮(图6)，浪费样品;4 μ

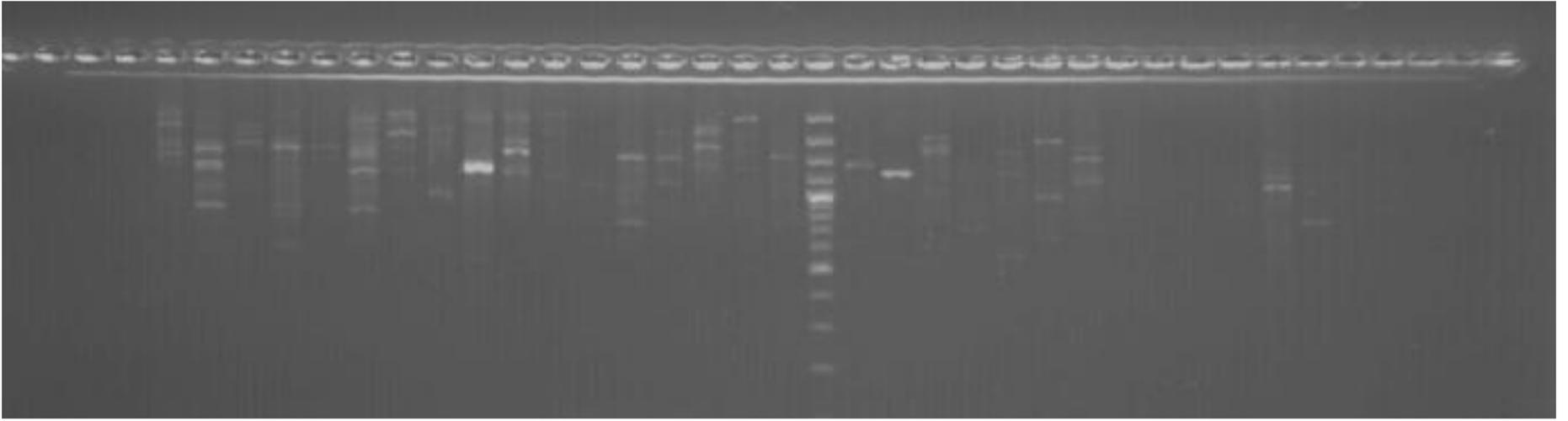


图5 点样量为3 μ 的RAPD 扩增结果

Fig.5 RAPD amplification results with the sampling amount of 3 μ

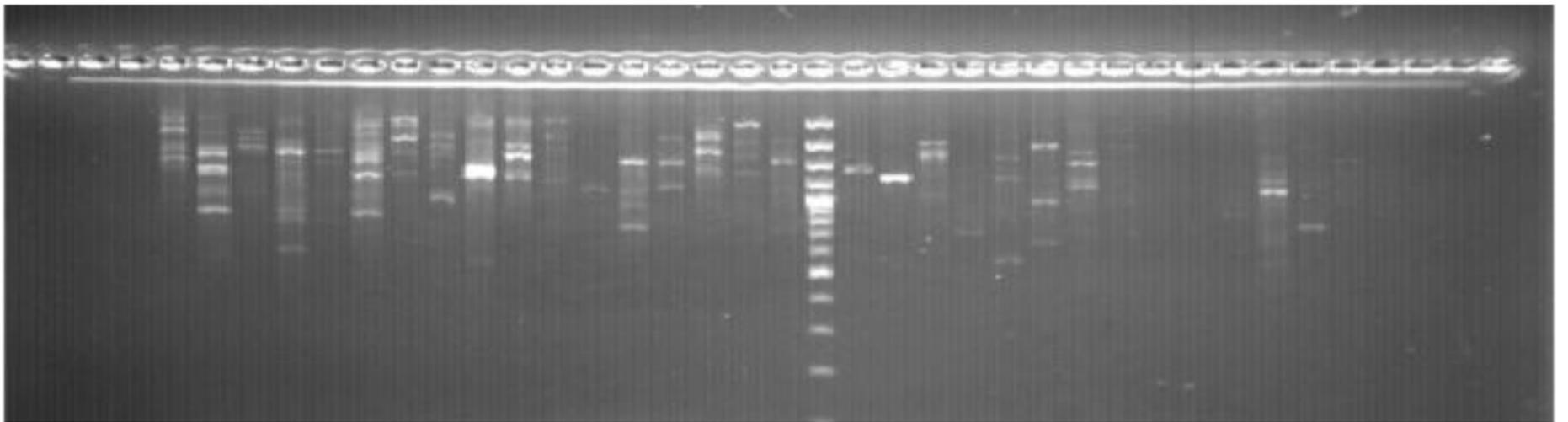


图6 点样量为4 μ 的RAPD 扩增结果

Fig.6 RAPD amplification results with the sampling amount of 4 μ

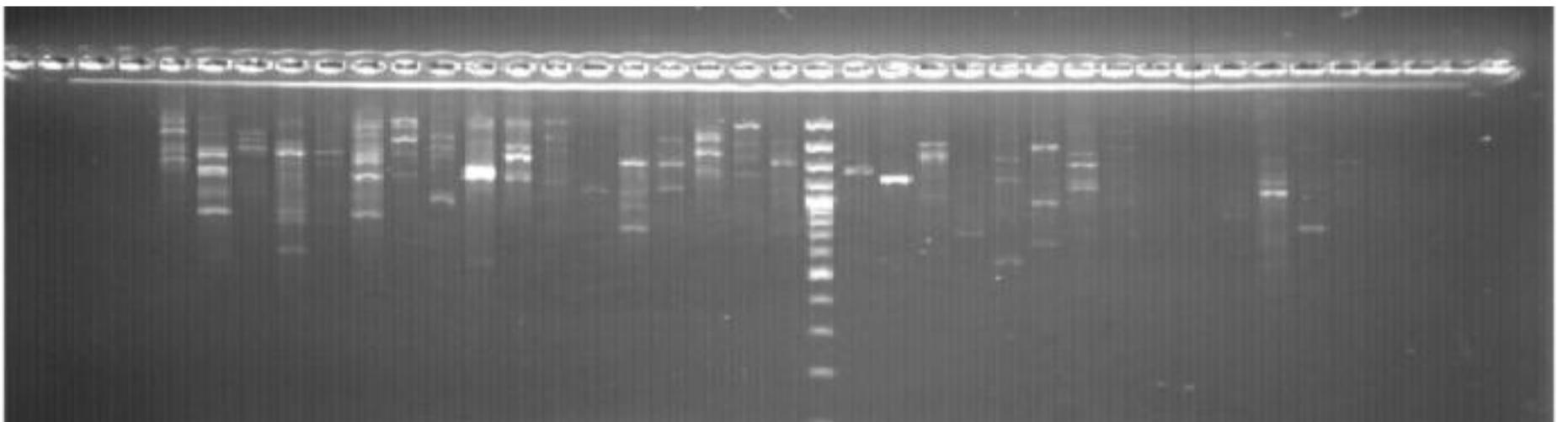
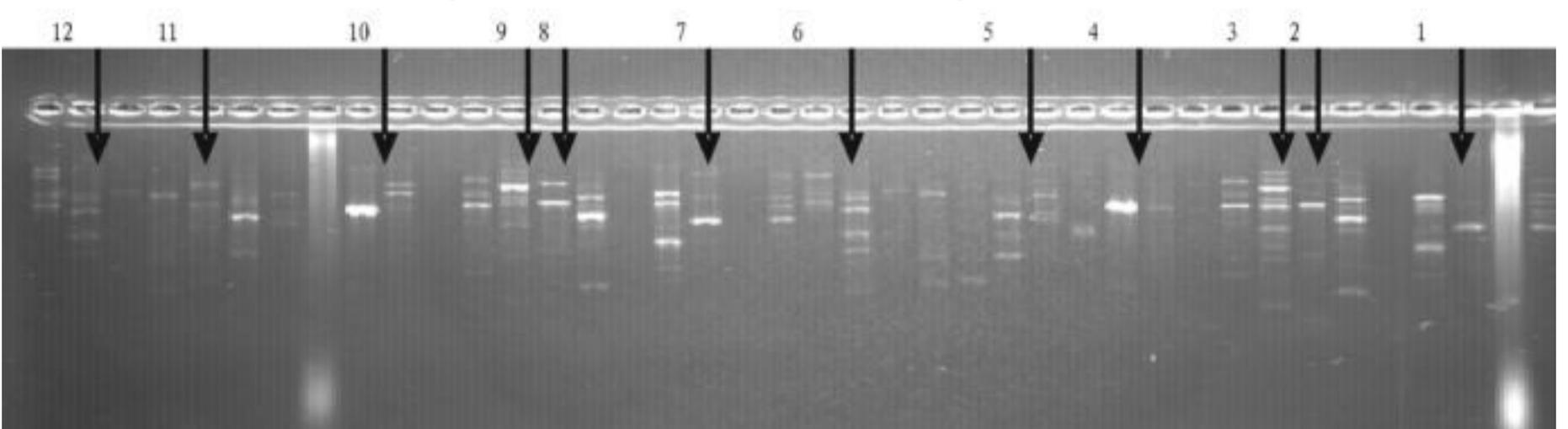


图7 点样量为5 μ 的RAPD 扩增结果

Fig.7 RAPD amplification results with the sampling amount of 5 μ



注: 甜高粱8113 (抗病) (1~6)、甜高粱8101(感病) (7~12)、S-56(1)、S67(2)、S70(3)、S72(4)、S75(5)、S78(6)。

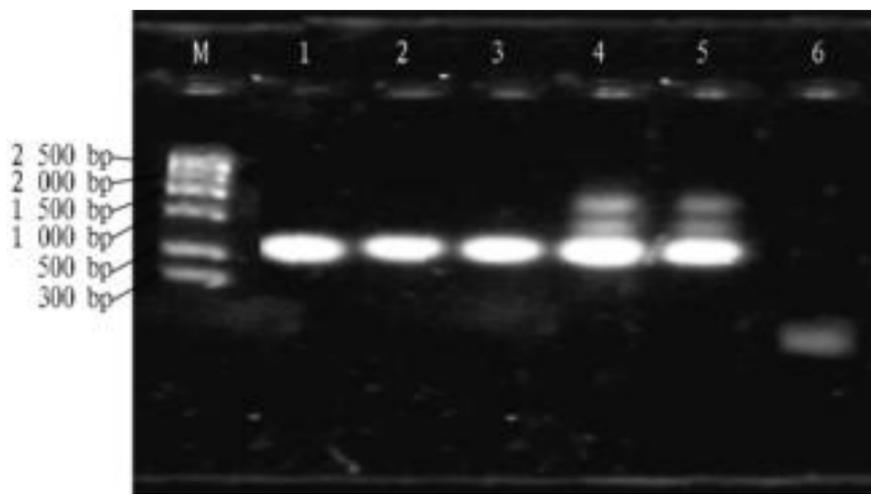
Note: 1-6 stand for DNA from sweet sorghum resistant variety 8113 and 7-12 stand for DNA from sweet sorghum susceptible variety 8101. 1, S-56; 2, S67; 3, S70; 4, S72; 5, S75; 6, S78.

图8 感性和抗性高粱DNA的RAPD 扩增反应

Fig.8 RAPD amplification reaction of DNA from susceptible and resistant sorghum

(下转第6886页)

于 HS07B 的电泳结果有杂带,估计是由于研磨产生的机械力对 DNA 链结构的破坏造成的。而化学改良法提取 2 株菌的基因组 DNA,作为模板均能很好地扩增出目的片段,由于总 DNA 得率较高、样品 DNA 含量较高(图 3,HS07B),故进行 PCR 扩增时需要稀释。



注:1 以图 3 中的 2 为模板;2,3 以图 3 中 HS07B 的 1 分别稀释 1/10 和 1/50 为模板;4 和 5 分别以图 1 中 HS07B 的 1 为模板;6 为阴性对照。

Note:1, Taking 2 in Fig.3 as the template;2 and 3, Taking 1 from HS07B in Fig.3 after dilution 1/10 and 1/50 as the template;4 and 5, Taking 1 from HS07B in Fig.1 as the template;3, Negative control.

图 5 HS07A 和 HS07B 的 ITS 序列扩增结果

Fig.5 The amplification results of ITS sequence from HS07A and HS07B

(上接第 6883 页)

2.3 甜高粱抗丝黑穗病基因的 RAPD 分析 该试验选用 60 个随机引物,对甜高粱抗丝黑穗病品种 8113(抗亲)和甜高粱感丝黑穗病品种 8101(感亲)的 DNA 进行 RAPD 扩增,共 27 个引物扩增出多态性谱带,其中只有 6 个引物在抗感品种基因组间扩增出差异谱带,这 6 个引物分别为 S56、S67、S70、S72、S75、S78(图 8)。

3 结论与讨论

3.1 DNA 提取方法的分析 由试验结果得出 CTAB 法适宜提取 DNA。

3.2 RAPD 检测条件的优化 试验过程中,分别对电泳检测电压和点样量进行了优化,在该试验条件下 60 V 时检测效果最佳,4 μ l 的点样量为最适。

3.3 甜高粱抗丝黑穗病基因的 RAPD 扩增结果 该试验以甜高粱抗丝黑穗病品种 8113(抗病)和甜高粱感丝黑穗病品种 8101(感病)为试材,对 60 个随机引物进行筛选,筛选的结果表明有 27 个扩增出多态性谱带,其中有 6 个引物 S56、S67、S70、S72、S75、S78 在抗感品种间扩增出差异谱带,可以寻找抗亲和感亲在基因序列的差异,可以用于抗感基因组的进一步分析,为找到与抗丝黑穗病基因紧密连锁的分子标记奠定基础,进而对选育抗丝黑穗病的甜高粱优良品种起到指导

3 结论

由于酵母菌 HS07A 的细胞壁较厚,用常规的煮沸裂解法等不能有效地破坏其细胞壁,PCR 扩增也未能扩增出目的片段。石英砂研磨法和反复研磨冻融法均能有效地破坏其细胞壁,但是由于研磨过程中机械力的作用而造成部分基因组 DNA 的破坏,对基因组 DNA 提取的完整性和高质量造成影响,也造成 PCR 扩增有杂带。

改良的提取基因组 DNA 的方法,除去了机械破壁过程,减少了机械力对 DNA 造成的破坏,运用阴离子去污剂 SDS 提取 DNA 安全、价廉。总的来说,该方法温和、廉价、安全、高效、简单易操作,能有效、完整地提取高质量的基因组 DNA,凝胶电泳条带清晰,用于 PCR 模板能有效地扩增出目的片段,适合多种真菌和细菌基因组 DNA 的提取。

参考文献

- [1] 崔丽霞,韩建荣.青霉 DNA 提取方法比较研究[J].山西大学学报:自然科学版,2004,27(2):185-187.
- [2] 杨月梅,江贤章,黄建忠.扩展青霉(*Pericillium expansum*) PF898 基因组 DNA 提取方法的比较[J].福建师范大学学报:自然科学版,2007,23(2):81-84,108.
- [3] 何叶喧,王世英,李兵,等.一种快速提取丝状真菌产黄青霉 DNA 的方法[J].中国抗生素杂志,2005(8):503-504.
- [4] 杨莲茹,杨晓野,刘珍莲,等.少孢节丛孢菌 DNA 提取及 18S rDNA 基因序列扩增试验[J].内蒙古农业大学学报:自然科学版,2004(3):41-44.
- [5] LECLERC MC, GUILLOT J, DEMILLE M. Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprdegiaaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 77: 369-377.

意义。

参考文献

- [1] 中国农业部.农业生物质能产业发展规划(2007~2015年)[EB/OL].
<http://www.agri.gov.cn/xlhb/F020070705456007024820.doc>, 2007.
- [2] 中华人民共和国国家发展和改革委员会.可再生能源中长期发展规划[EB/OL].
<http://www.ndrc.gov.cn/zcfb/zcf-btz/2007tongzhi/V020070904607346044110.pdf> 2007.
- [3] 张志鹏,杨镇,朱凯,等.可再生能源作物甜高粱的开发利用[J].杂粮作物,2005,25(5):334-335.
- [4] 高士杰,刘晓辉,李玉发,等.中国甜高粱资源与利用[J].杂粮作物,2006,26(4):273-274.
- [5] 黎大爵.亟待开发的甜高粱酒精燃料[J].中国农业科技导报,2003,5(4):48-51.
- [6] 肖明松,杨家象.甜高粱茎秆固体发酵制取乙醇产业化示范工程[J].农业工程学报,2006,22(S1):207-210.
- [7] HARLAN J R, DEWET J M J. A simplified classification of cultivated sorghum[J]. Gop Si, 1971, 12: 172-176.
- [8] 杨文华.甜高粱在我国绿色能源中的地位[J].中国糖料,2004(3):57-59.
- [9] 王振华,孔雪华,韩瑞东.甜高粱病虫害及其防治[J].特种经济动植物,2004(6):43-44.
- [10] 许丽,李癯莹,林凤. DNA 分子标记及其在作物遗传育种中的应用[J].沈阳师范大学学报,2006,24(4):465-469.
- [11] 柳春玲,侯军红,关立,等.分子标记及其在标记辅助中的最新应用[J].陕西农业科学,2006(4):62-70.
- [12] WANG Y J, LAMIKARA O. Analysis of sequencing the RAPD marker linked to seedless genes in grapes[J]. Northeastern Agricultural University, 1997, 25(4): 1-5.
- [13] 李癯莹,赵姝华,刘世强.高粱 DNA 提取纯化方法的比较及 RAPD 反应条件的建立与优化[J].杂粮作物,2001,21(2):12-15.