

1.4 RAPD 引物筛选

1.4.1 供试引物 供试引物为上海生工生物工程技术服务有限公司生产的 10 个碱基随机引物, 共 169 个。用全部菌株的混合 DNA 液作为筛选引物的模板, 采用单引物进行 PCR 扩增来筛选引物的方法, 根据扩增产物在 1.5% 琼脂糖电泳条件下条带有无、条数多少、重复性, 确定扩增较好的单、双引物为扩增引物, 然后再分别对供试的 24 个菌株进行 PCR 扩增, 3 次重复。

1.4.2 RAPD 反应体系 RAPD 反应采用 20 μ L 体系, 对 DNA 模板、dNTP、引物和 Taq 酶分别采用不同比例进行配比后, 在 ThermoHYbaid PCR Express 多功能扩增仪上进行 RAPD 扩增, 并设定不同的循环参数。寻找重复率高, 特异性强的条件作为 RAPD 引物筛选的反应体系。

1.4.3 RAPD 反应产物电泳检测 RAPD 反应产物与 2 μ L 溴酚兰指示剂混匀后, 加样于 1.5% 琼脂糖凝胶上, 同时, 加 1kb 的 marker 为分子量对照, 于 1 \times TAE 中, 电压为 4 V/cm, 直至溴酚兰指示剂距离凝胶前缘 1cm, 停止电泳, 取出凝胶, 置 EB 染色液中染色后, 于紫外透射仪下拍照。

2 结果与分析

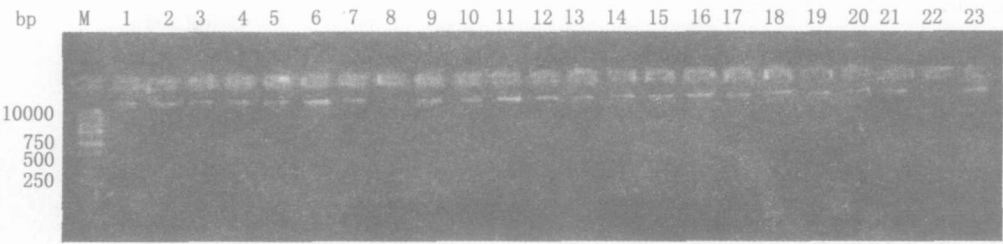
2.1 DNA 质量和纯度检测

从 24 个菌株中提取的 DNA 样品(表 2), 其

表 2 提取 DNA 纯度和含量测定结果

菌株编号	纯度	浓度(μ g/ μ L)
03-11	2.10	0.915
03-20	1.64	0.423
03-25	1.70	0.355
03-12	1.93	0.391
03-02	1.66	0.507
03-29	1.94	0.830
03-27	2.39	0.119
03-23	1.80	0.172
03-14	2.48	0.278
03-08	1.84	0.191
03-18	1.93	0.392
03-22	1.77	0.311
03-16	1.81	0.665
03-07	1.69	0.444
03-26	1.85	0.192
03-17	1.85	0.564
03-21	1.79	0.231
03-04	1.78	0.413
03-13	1.98	0.266
03-28	2.39	0.419
03-03	1.88	0.393
03-10	1.77	0.394
03-01	1.69	0.518
03-15	1.78	0.423

A_{260}/A_{280} 值在 1.64~2.48, 说明可以用于 RAPD 扩增。24 个菌株 DNA 含量介于 0.119~0.915 μ g/ μ L, 其中菌株 03-27 DNA 浓度最低, 为 0.119 μ g/ μ L, 而 03-11 DNA 浓度最高。从图 1 可以看出, 从 23 个菌株(因电泳槽只有 24 个点样孔, 所以只对 23 个样品进行了分子量测量)中均提取到了 DNA,



1: 03-11; 2: 03-20; 3: 03-25; 4: 03-12; 5: 03-02; 6: 03-29; 7: 03-27; 8: 03-23; 9: 03-14; 10: 03-08; 11: 03-18; 12: 03-22; 13: 03-16; 14: 03-07; 15: 03-26; 16: 03-17; 17: 03-21; 18: 03-04; 19: 03-13; 20: 03-28; 21: 03-03; 22: 03-10; 23: 03-01; 下同

图 1 菌株 DNA 分子量的检测

而且所有菌株的分子量大小相似, 分子量大于 1kb。

2.2 RAPD 反应体系

经过筛选, 确定最佳优化体系为: 10 \times buffer 2 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 2 μ L, dNTP 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 引物 2 μ L, Taq 0.4 μ L (5 U/ μ L), ddH₂O 11.8 μ L。

反应循环参数: 预变性: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 扩增: 94 $^{\circ}$ C 1min, 37 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 共 45 个循环; 延伸: 72 $^{\circ}$ C 10min; 程序结束后进入 4 $^{\circ}$ C 状态。

2.3 引物筛选结果

使用全部菌株的混合样品, 从 169 个随机引物中筛选出 24 个扩增效果较好的引物, 其中有 9 个单引物和 3 个双引物可使 24 个菌株都能扩增出谱带, 筛选结果见表 3。单引物共扩增出谱带 73 条, 双引物扩增出谱带 19 条, 共计 92 条。其中, 单引物扩增谱带中有 9 条为共同谱带, 62 条为多态性谱带。双引物中共同谱带 1 条, 18 条为多态性谱带。单引物 S₁₄₄₉ 扩增的谱带数最多为 10 条, S₄₄₄ 和 S₃₆₃

均扩增出 9 条谱带。双引物组合 S₄₂₂ 和 S₁₁₈₁ 扩增出 9 条谱带。

表 3 RAPD 扩增引物筛选结果

引物	核苷酸碱基序列 5'→3'	RAPD 标记数	多态性 标记数
S ₄₄₄	AAGTCGCTC	9	7
S ₁₄₄₉	TGGCTTCTCC	10	6
S ₂₄	AATCGGGCTG	8	6
S ₃₄₁	CCCGGCATAA	10	10
S ₃₆₃	CCAGCTTAGG	9	9
S ₁₂₀₃	GTGAGGCGCA	7	6
S ₄₀₅	GGAACGTGT	7	5
S ₂₃	AGTCAGCCAC	10	10
S ₂₀₁	GGGCACTCA	9	9
S ₄₄₄ +S ₂₀₁	AAGTCGCTC GGGCACTCA	6	5
S ₁₀₈₅ +S ₄₃	GA TGCCGCA GTGCGCGTCA	4	4
S ₄₂₂ +S ₁₁₈₁	ACCAGGGGCA GGCAGGTGGA	9	9

2.4 部分引物 RAPD 扩增结果

24 个菌株经 12 个引物扩增后谱带数最多的是菌株 03-10, 共 59 条, 最少的是菌株 03-12, 共 31 条。从扩增结果图谱来看, 24 个菌株的谱带既表现出了病菌种内的遗传稳定性, 又反映出了不同菌株之间的遗传差异(图 2~7 中 24 为菌株 03-15), 说明 RAPD 分子标记可为玉米丝黑穗病菌的群体遗传提供一定的多态性标记。同时, 从图谱中一方面可看出同一引物对不同菌株扩增, 其谱带多态性差异明显: 有的引物不同菌株间具有共同谱带, 如 S₄₄₄ 扩增出的 9 条谱带中有 2 条带相同(图 4), 相同遗传位点占 18.18%。有的引物扩增出的谱带全部为多态性谱带, 如引物 S₃₄₁ 扩增的结果(图 5)。而且菌株间的扩增谱带数量也不相同, 菌株 03-08, 03-07 和 03-04 用 S₃₄₁ 引物扩增仅有 1 条带, 而 03-10 则有 6 条。另一方面, 同一菌株用不同引物扩增, 谱带差异也很大, 如 03-08 用引物 S₃₄₁ 扩增仅有 1 条带, 而用 S₁₄₄₉ 扩增则出现了 10 条带(图 2)。

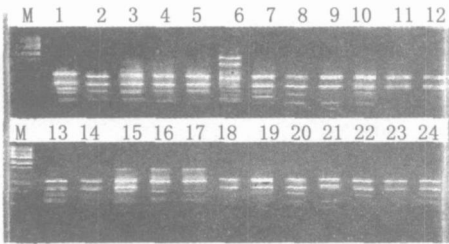


图 2 引物 S₁₄₄₉ 的 RAPD 扩增图谱



图 3 引物 S₂₄ 的 RAPD 扩增图谱

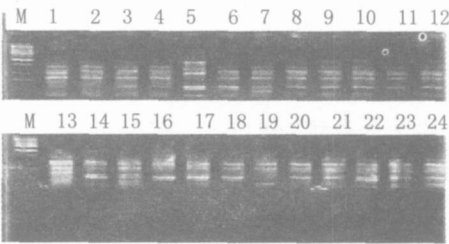


图 4 引物 S₄₄₄ 的 RAPD 扩增图谱

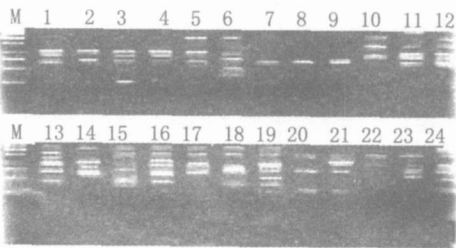


图 5 引物 S₃₄₁ 的 RAPD 扩增图谱

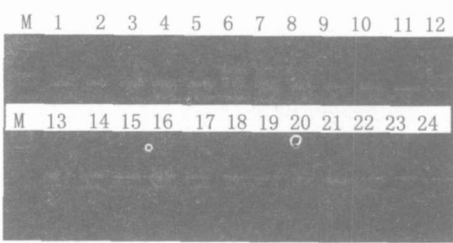


图 6 引物 S₁₂₀₃ 的 RAPD 扩增图谱

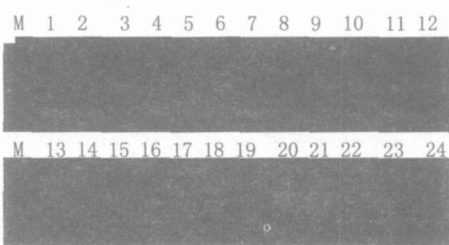


图 7 引物 S₂₀₈₅+S₄₃ 的 RAPD 扩增图谱

小麦主推品种及优良品系综合抗病性鉴定与评价

陈 琦, 郭松景, 卓喜牛
(漯河市农业科学院, 河南 漯河 462000)

摘要: 2005~2006 年度, 在漯河市农业科学院小商桥试验田, 对 149 个小麦推广品种和优良品系进行以抗纹枯病、白粉病、条锈病为主的综合抗病性鉴定。在供试材料中, 对 3 种病害同时免疫的只有轮 01-11, 占鉴定总数的 0.7%; 对 2 种病害免疫的有 9818, BN160, 321, 源育 5 号和新乡 9408 等 5 个占鉴定总数的 3.4%; 对 1 种病害免疫的有 2016、品洛 6510 和郑麦 863 等 24 个占鉴定总数的 16.1%。结果表明, 所鉴定小麦材料的综合抗病性较差。

关键词: 小麦品种(系); 纹枯病; 白粉病; 条锈病; 抗病性鉴定

中图分类号: S512.1 S432.2⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)04-0056-03

河南省是一个农业大省, 小麦播种面积为 492 万 hm^2 , 是冬小麦的适宜种植区, 同时也是我国小麦的主产区之一。但是, 由于白粉病等各种病害的危害, 常造成严重的产量损失, 大大影响小麦品质, 也是全球性小麦增产的最大限制因子。利用抗病品种是防治小麦病害最经济有效的措施。为了了解小麦品种(系)对纹枯病、白粉病、条锈病的抗性, 按照河南省农业科学院植保所统一方案, 对河南省小麦主

推品种(系)进行成株期综合抗病性鉴定, 现把 2005~2006 年漯河市鉴定结果总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料

供试小麦材料 149 个, 为省内外征集的小麦推广品种、优良品系, 均由河南省农业科学院植保所搜集供种。

收稿日期: 2006 12 26

作者简介: 陈 琦(1972), 女, 河南周口人, 研究实习员, 主要从事植物保护研究工作。

引物扩增图谱的差异性说明一方面菌株间有较近的亲缘关系, 用某些引物就能扩增出遗传位点一致的图谱, 另一方面病菌菌株间存在较丰富的遗传物质差异, 有较明显的遗传分化现象。

3 结论与讨论

经过 RAPD 条件的优化, 筛选出了 9 个单引物和 3 个双引物, 分别为 S₄₄₄, S₁₄₄₉, S₂₄, S₃₄₁, S₃₆₃, S₁₂₀₃, S₄₀₅, S₂₃, S₂₀₁, S₄₄₄ + S₂₀₁, S₁₀₈₅ + S₄₃ 和 S₄₂₂ + S₁₁₈₁, 可用于玉米丝黑穗病菌 RAPD 分子标记。但这些引物所扩增出的多态性条带较少, 而且双引物扩增图谱中分出明显的两部分条带, 一部分条带远离另一部分, 互不干扰, 但并不是 2 个单引物扩增条带的叠加, 如 S₄₄₄ 和 S₂₀₁₂ 2 个单引物单独扩增时分别能扩增出 9 条谱带, 但组合引物仅能扩增出 6 条谱带, 其中一部分谱带较粗, 可能是 2 个引物扩增出谱带的重叠(图 7), 这可能是与玉米丝黑穗病菌本身生长性状的特殊性有关, 也可能是引物组合不适

宜于玉米丝黑穗病菌 DNA RAPD 分析, 这还有等于进一步研究。

参考文献:

- [1] 华致甫, 白宝璋, 赵晓军. 玉米丝黑穗菌生理分化研究[J]. 吉林农业大学学报, 1995, 17(2): 32-35.
- [2] 贺字典, 高增贵, 庄敬华, 等. 玉米丝黑穗菌生理分化研究[J], 中国农学通报, 2006, 22(7): 428-430.
- [3] 安鑫龙, 董金皋, 韩建民. 玉米大斑病菌的 RAPD 分析 I 应用 CTAB 法提取玉米大斑病菌 DNA[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 38-41.
- [4] 鄢洪海. 玉米弯孢叶斑病菌生理分化及分子生物学研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2001.
- [5] 刘学堂, 郭金城, 张元恩, 等. 棉花黄萎病菌 gDNA 提取方法和不同单孢的 RAPD 分析[J]. 河南农业大学学报, 1999, 33(3): 274-278.
- [6] 王殿修. 吉林省玉米丝黑穗病菌致病性分化与 RAPD 分析[M]. 长春: 吉林农业大学, 2004.
- [7] 贺字典, 高增贵, 庄敬华, 等. 玉米丝黑穗病菌 DNA 提取方法比较研究[J]. 河北科技师范学报, 2005(2): 77-78.