

# 玉米丝黑穗病菌 RAPD 分析的引物筛选

贺字典<sup>1</sup>, 陈捷<sup>2\*</sup>, 高增贵<sup>3</sup>, 庄敬华<sup>3</sup>, 高玉峰<sup>1</sup>

(1. 河北科技师范学院 农学系, 河北 秦皇岛 066000; 2. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 201101;  
3. 沈阳农业大学 农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 采用 CTAB 法提取了玉米丝黑穗病菌 DNA, 研究了 RAPD 最佳优化条件, 确定为 20 $\mu$ L 体系中 10 $\times$  buffer 2 $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ L, dNTP 0.5 $\mu$ L, DNA 模板 2 $\mu$ L, 引物 2 $\mu$ L, Taq 0.4 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 11.8 $\mu$ L, 并为玉米丝黑穗病菌 RAPD 分析筛选出了 9 个单引物和 3 个双引物。

**关键词:** 玉米丝黑穗病菌(*Sporisorium reilianae*); RAPD; 引物筛选

**中图分类号:** S435.131.4<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)04-0053-04

华致甫等<sup>[1]</sup>、贺字典等<sup>[2]</sup>对玉米丝黑穗病菌的致病力进行了试验, 认为我国至少存在 5~7 个生理小种。用鉴别寄主来鉴定生理小种易受栽培环境、人为判断等因素的影响, 难以做出客观的结论。而 DNA 对各个生理小种来说则是稳定的, 如生理小种间存在遗传物质的差异, 则能从根本上说明小种致病力的分化, 因此, RAPD 由于其独特的优点已成为一种重要的病菌生理分化的分子标记<sup>[3-5]</sup>, 但有关玉米丝黑穗病菌 RAPD 分析的报道较少<sup>[6]</sup>。引物筛选是利用 RAPD 分子标记进行各种遗传分析的基础, 也是进行 RAPD 标记的前提, 因此, 该研究可为玉米丝黑穗病菌的 RAPD 分子标记提供有用的引物, 具有重要的理论和实践意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

供试菌株采自辽宁、黑龙江、吉林、四川和河北等我国主要玉米产区, 共 23 个菌株(表 1), 所有菌株均为经单孢分离的纯化菌株。

### 1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法, 提取玉米丝黑穗病菌 DNA, 略有改动<sup>[7]</sup>。

### 1.3 DNA 纯度和质量测定

用紫外/可见分光光度计检测所提 DNA 的纯度, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在 1.7~2.0 时, 可用于 RAPD 扩增。然后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳和凝胶自动成

像系统检测所提 DNA 的完整性, PCR 扩增检测 DNA 提取的效果。

表 1 玉米丝黑穗病菌 RAPD 的供试菌株

菌株编号	寄主品种	采集地点
03-11	强盛 54	丹东
03-20	丹 111	大石桥
03-25	铁丹 12	瓦房店
03-12	未知	承德
03-02	吉单 180	长春
03-29	庄河 1 号	丹东
03-27	高粱	沈阳
03-23	四单 19	哈尔滨
03-14	沈丹 10	瓦房店
03-08	中原 2 号	保定
03-18	98-1	大石桥
03-22	新铁 10	长春
03-16	KX1561	锦州
03-07	未知	成都
03-26	LD999	铁岭
03-17	京科 92	沈阳
03-21	农大 108	锦州
03-04	海河 4 号	瓦房店
03-13	自交系 37	铁岭
03-28	沈试 2032	锦州
03-03	沈丹 16	瓦房店
03-10	辽 127	沈阳
03-01	辽 679	锦州
03-15	锦农 214	丹东

注: 03-27 寄主作物为高粱

收稿日期: 2006 11 11

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA509B04-04); 河北科技师范学院青年基金资助(2006NY016)

作者简介: 贺字典(1972), 女, 河北任丘人, 讲师, 硕士, 主要从事植物病理生理学的教学与研究工作。

通讯作者: 陈捷(1959), 男, 浙江绍兴人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病理学的教学和研究工作。

## 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 4V/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

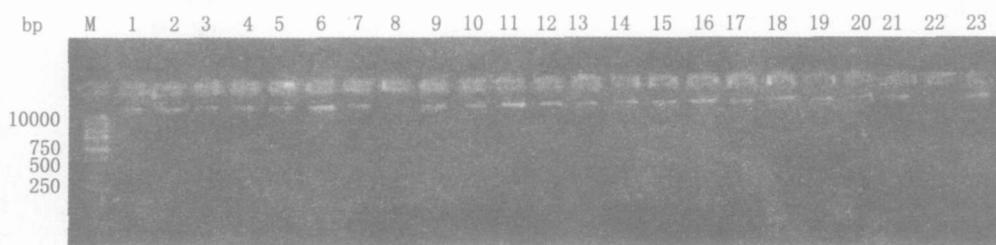
### 2.1 DNA 质量和纯度检测

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( $\mu$ g/ $\mu$ 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 $\mu$ g/ $\mu$ L, 其中菌株 03-27 DNA 浓度最低, 为 0.119 $\mu$ g/ $\mu$ 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 $\mu$ L, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ L, dNTP 0.5 $\mu$ L, DNA 模板 2 $\mu$ L, 引物 2 $\mu$ L, Taq 0.4 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 11.8 $\mu$ L。

反应循环参数: 预变性: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 扩增: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 37 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 45 个循环; 延伸: 72 $^{\circ}$ C 10 min; 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 S<sub>1449</sub> 扩增的谱带数最多为 10 条, S<sub>444</sub> 和 S<sub>363</sub>

均扩增出 9 条谱带。双引物组合 S<sub>422</sub> 和 S<sub>1181</sub> 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 <sub>444</sub>	AAGTCGCTC	9	7
S <sub>1449</sub>	TGGCTTCTCC	10	6
S <sub>24</sub>	AATCGGGCTG	8	6
S <sub>341</sub>	CCCGCATAA	10	10
S <sub>363</sub>	CCAGCTTAGG	9	9
S <sub>1203</sub>	GTGAGGCGCA	7	6
S <sub>405</sub>	GGAACGTGT	7	5
S <sub>23</sub>	AGTCAGCCAC	10	10
S <sub>201</sub>	GGGCACTCA	9	9
S <sub>444</sub> +S <sub>201</sub>	AAGTCGCTC GGGCACTCA	6	5
S <sub>1085</sub> +S <sub>43</sub>	GACTGCCGCA GTGCCGTCA	4	4
S <sub>422</sub> +S <sub>1181</sub>	ACCAGGGCA GGCAGGTGA	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 S<sub>444</sub> 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 S<sub>341</sub> 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 S<sub>341</sub> 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 S<sub>341</sub> 扩增仅有 1 条带, 而用 S<sub>1449</sub> 扩增则出现了 10 条带(图 2)。

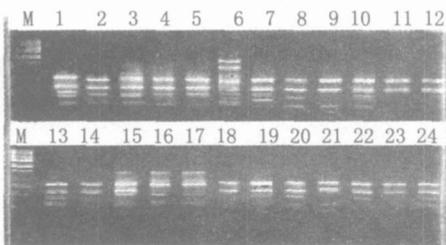


图 2 引物 S<sub>1449</sub> 的 RAPD 扩增图谱

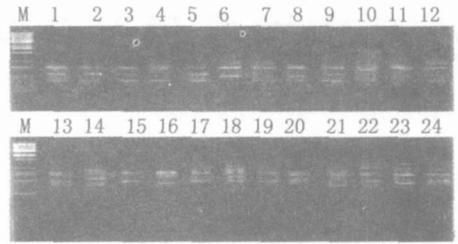


图 3 引物 S<sub>24</sub> 的 RAPD 扩增图谱

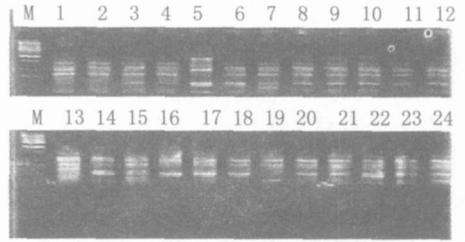


图 4 引物 S<sub>444</sub> 的 RAPD 扩增图谱



图 5 引物 S<sub>341</sub> 的 RAPD 扩增图谱

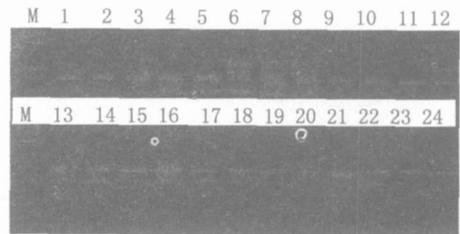


图 6 引物 S<sub>1203</sub> 的 RAPD 扩增图谱

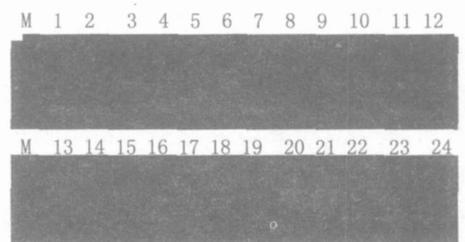


图 7 引物 S<sub>2085</sub>+S<sub>43</sub> 的 RAPD 扩增图谱

# 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<sup>+</sup>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<sup>2</sup>, 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, 现将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S<sub>444</sub>, S<sub>1449</sub>, S<sub>24</sub>, S<sub>341</sub>, S<sub>363</sub>, S<sub>1203</sub>, S<sub>405</sub>, S<sub>23</sub>, S<sub>201</sub>, S<sub>444</sub>+S<sub>201</sub>, S<sub>1085</sub>+S<sub>43</sub>和S<sub>422</sub>+S<sub>1181</sub>, 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S<sub>444</sub>和S<sub>2012</sub> 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.