

颜学慧,梁 缘,沈梦茹,等. 高粱 DNA 提取方法筛选及其在叶色性状基因定位中的应用[J]. 江苏农业科学,2023,51(12):50–56.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2023.12.006

# 高粱 DNA 提取方法筛选及其在叶色性状基因定位中的应用

颜学慧, 梁 缘, 沈梦茹, 王佑栋, 刘言龙, 李杰勤, 詹秋文  
(安徽科技学院农学院, 安徽凤阳 233100)

**摘要:**获得高质量的 DNA 是分子试验的一个先决条件,常用的植物 DNA 提取过程及步骤繁杂,需要进行多次离心操作,所需时间较长,并且在 DNA 提取过程中会用到三氯甲烷和其他一些有毒试剂,对操作人员有一定危害。为了筛选出高粱 DNA 的最优提取方法,进行基因定位等方面的研究,采用十二烷基硫酸钠(SDS)法、SDS+2% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、CTAB+2% PVP 法和磁珠法,提取高粱不同部位(嫩叶、老叶、根、茎、种子)的 DNA,然后对其提取步骤、DNA 浓度、吸光度、PCR 扩增效果等进行比较。结果表明,磁珠法步骤简单、无毒、低成本,所需时间仅为其他几种方法的 1/3,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  为 1.8~2.0, DNA 的质量、纯度、浓度优于其他方法。各试验数据表明,磁珠法提取的 DNA 最适于分子生物学实验,将其应用于高粱叶色性状基因的定位,可将紫色叶片基因 *PL1* 初步定位到 4 号染色体上,白条纹叶基因 *WSL10* 初步定位到 10 号染色体上。

**关键词:**高粱;DNA;磁珠法;紫叶;白条纹叶;基因定位

**中图分类号:**S514.032 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2023)12–0050–07

高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]为禾本科高粱属一年生草本 C4 植物<sup>[1]</sup>,是继小麦、水稻、玉米和大麦之后世界第五大谷类作物,其籽粒富含淀粉、蛋白质和矿物质等营养成分<sup>[2–3]</sup>。高粱光合效率高,生物量大,高效节水,抗旱,耐盐碱,耐贫瘠,富含糖分,对土壤和环境具有极强的适应能力和抗逆特性<sup>[4]</sup>。高粱也是一种很好的饲料作物,营养价值高,适口性好,草食家畜采食后易消化,可显著提高反刍家畜的消化机能及机体的免疫力和泌乳量<sup>[5–7]</sup>。另外,高粱还被广泛用于淀粉、酿酒和乙醇产业,其中甜高粱作为能源作物在生物燃料方面展现出广阔的开发利用前景<sup>[8–10]</sup>。

近年来,高粱分子标记研究及重要农艺性状基因克隆、DNA 文库构建、数量性状座位(QTL)定位

等方面的研究成为分子生物学的研究热点<sup>[11–14]</sup>。快速、经济、安全、高质量的 DNA 提取方法能够提高转基因试验中转基因植株的检测效率<sup>[15]</sup>。优质提取 DNA 的方法应具有高效、快速、简单、污染小等优点,此外安全性、经济价值也是值得注意的关键因素。目前,高粱 DNA 提取方法主要有十二烷基硫酸钠(SDS)法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、尿素法和 NaOH 法等<sup>[16]</sup>,但在 DNA 提取过程中使用的试剂对 DNA 的完整性和质量都有一定影响,往往安全性差,所耗时间长,难以达到快速且质量高的效果。

植物叶色突变体是研究作物光合作用、叶绿素合成与降解及其生长发育调控机制的重要材料,国内外对叶色的研究主要集中在杂种纯度的快速鉴定上,也有将其运用到育种工作中<sup>[17]</sup>。如杨颜榕等在水稻叶色遗传机制与基因克隆、分子调控机制及其在水稻育种上的应用方面开展了探索<sup>[18]</sup>;任永梅等进行了水稻白条纹叶突变体 *ws11* 的生理特性分析及基因定位研究<sup>[19]</sup>;金怡等对水稻苗期白条纹叶及抽穗期白穗突变体进行鉴定和基因定位,成功克隆了 *WSLWP* 基因<sup>[20]</sup>。高粱叶片基本都为绿色,但因叶片中色素比例不同,也会出现条纹叶、黄化叶、白化叶、斑点叶和紫叶等,育种者希望利用叶色标记进行种子纯度鉴别<sup>[21]</sup>。李杰勤等用高粱棕色中

收稿日期:2022–08–21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31971993);国家重点研发计划(编号:2018YFD0300902);安徽省支持科技创新有关政策兑现项目(编号:皖科资秘[2021]475号);安徽省级学科建设重大项目(编号:皖教秘科[2014]28号);安徽省教育厅高校科学研究项目(编号:KJ2020A0066)。

作者简介:颜学慧(1996—),女,安徽天长人,硕士研究生,研究方向为饲料作物遗传育种。E-mail:2139749277@qq.com。

通信作者:詹秋文,博士,教授,主要从事饲料作物遗传育种方面的研究。E-mail:qwzhan@163.com。

脉材料(*bmr-6*)与白色中脉材料杂交构建  $F_2$  代分离群体,并用 SSR 分子标记对 *bmr-6* 进行了基因定位,初步将该基因定位于第 7 连锁群<sup>[22]</sup>。但是,如何构建高粱紫色和白条纹叶遗传作图群体,并了解其叶色性状的遗传和相关基因定位,目前未见报道。

本研究通过 SDS 法、SDS + 2% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)法、CTAB 法、CTAB + 2% PVP 法和磁珠法,分别对高粱不同部位进行 DNA 提取,再进行 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳进行扩增条带的比较,筛选出高粱 DNA 提取的最优方法,并将其应用于高粱紫叶、白条纹叶基因的定位,以期为高粱分子遗传育种提供理论依据和应用参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

绿叶高粱 Tx430、突变体白条纹高粱 WSL10 和紫叶高粱 IS31557 种子由安徽省饲草育种与利用重点实验室提供。

提取高粱 DNA 使用的试验材料为 Tx430,于 2020 年 9 月种植于安徽科技学院种植科技园内。紫叶性状基因定位群体的母本为绿叶高粱 Tx430,父本为紫叶高粱 IS31557。2020 年 5 月,将紫叶性状的父母本及  $F_2$  代种植于安徽科技学院种植科技园内,其中 Tx430 高粱、IS31557 高粱各种植 30 株, $F_2$  代分离群体共种植 1 000 株,种植密度行距为 50 cm,株距为 30 cm,每行 10 株,待表现出紫叶后及时进行调查统计和分析。白条纹叶高粱基因定位群体的母本为白条纹叶高粱突变体 WSL10,父本为绿叶高粱 Tx430。2020 年 11 月,将白条纹性状的父母本高粱及  $F_2$  代高粱种植于海南省三亚南繁基地,Tx430 高粱、WSL10 高粱各种植 30 株, $F_2$  代分离群体共种植 1 000 株。种植密度为行距 50 cm,株距 30 cm,每行种植 10 株,待白条纹性状出现后及时进行调查统计分析。

### 1.2 高粱 DNA 的提取方法

1.2.1 SDS 法 取适量试验材料,清洗干净后放入研钵中,加入液氮研磨成粉末,将粉末装入 2 mL 离心管中(每管 0.5 g),加 600  $\mu$ L SDS 提取液,65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min(每 10 min 轻轻摇匀 1 次);加入 120  $\mu$ L 预冷的醋酸钾(5 mol/L),轻轻摇匀,冰浴 30 min;加入 400  $\mu$ L 三氯甲烷-异戊醇溶液(体积比为 24:1),摇匀 30 min;12 000 r/min 离心 5 min;吸取 400  $\mu$ L 上清液于 1.5 mL 离心管中,加入 800  $\mu$ L 预

冷的无水乙醇,摇匀后于 -20  $^{\circ}$ C 冰浴 30 min,再于 12 000 r/min 离心 5 min;倒去上清液,加入 400  $\mu$ L 70% 乙醇,轻轻晃动,静置 5 min;倒出 70% 乙醇,将离心管倒扣在吸水纸上吸干水分,再加入 150  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,充分溶解后放于 -20  $^{\circ}$ C 冰柜中保存备用。

1.2.2 SDS + 2% PVP 法 取适量试验材料,清洗干净后放入研钵中,加入液氮,研磨成粉末。装入 2 mL 离心管中(每管 0.5 g),加 600  $\mu$ L SDS + 2% PVP 溶液,于 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min,每 10 min 轻轻摇匀 1 次。其余步骤同 SDS 法。

1.2.3 CTAB 法 取适量试验材料,清洗干净后放入研钵中,加入液氮研磨成粉末,装入 2 mL 离心管中(每管 0.5 g),加 600  $\mu$ L CTAB 溶液,于 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。其余步骤同 SDS 法。

1.2.4 CTAB + 2% PVP 法 取适量试验材料,清洗干净后放入研钵中,加入液氮研磨成细沫。装入 2 mL 离心管中(每管 0.5 g),加 CTAB + 600  $\mu$ L 2% PVP 溶液,于 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。其余步骤同 SDS 法。

1.2.5 磁珠法 取适量试验材料,清洗干净后放入研钵中,加入液氮研磨成细沫;装入 2 mL 离心管中(每管 0.5 g),加入 600  $\mu$ L 快速裂解液(1 L 配方:9.82 g KAC,18.61 g EDTA,477.65 g 盐酸胍,1.470 5 g 柠檬酸钠,20 mL 2% TWEEN, pH 值 5.2),于 65  $^{\circ}$ C 水浴 10 min(每隔 2 ~ 3 min 摇晃 1 次);于 12 000 r/min 离心 5 min;吸取 400  $\mu$ L 上清液于 1.5 mL 离心管中,分别加入 400  $\mu$ L DNA 结合液[1 L 配方:50 g 5% PEG 8000,4 mol/L 异硫氰酸胍(GITC),0.5 mol/L NaCl]、400  $\mu$ L 异丙醇、20  $\mu$ L 磁珠悬浮液,充分振荡;室温下静置 5 min,将离心管置于磁力架上静置 1 min;将离心管在磁力架上固定好,倒去上清液,再加入 400  $\mu$ L 70% 乙醇,充分振荡、混匀后于室温下静置 1 min,将离心管放回磁力架上,若离心管中的溶液还有青色,便重复上一步操作 2 ~ 3 次;将离心管倒置在吸水纸上风干 10 min;加入 150  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,充分振荡后于 65  $^{\circ}$ C 水浴 3 min;将离心管放在磁力架中,静置 2 min;吸出上清液,于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3 检测 DNA 扩增效果所用 SSR 引物及 PCR 反应体系与电泳方法

1.3.1 SSR 引物 为了检测 5 种方法提取 DNA 的质量,选取 2 对 SSR 引物,即 RAD1-11(F:5'-ACC CATGAGATCGAGGAA-3';R:5'-ATCGGACAAGC TAAGTGA-3')和 RAD2-6(F:5'-GGCATCTCCTT

CCTTCTCC-3';R:5'-GGTTGGGTACGGATGTGG-3'),用于下一步的 PCR 扩增。

1.3.2 PCR 反应体系和扩增程序 10 μL PCR 反应体系:2.0 μL DNA,1.5 μL 引物,0.5 μL *Taq* 酶,1 μL buffer,1 μL 脱氧核糖核苷三磷酸 (DNTPS),4 μL 水。扩增程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 7 min。

1.3.3 制胶与电泳 称取 3 g 琼脂糖倒入锥形瓶中,加入 100 mL TAE 缓冲溶液[是由三羟甲基氨基甲烷 (Tris base)、乙酸 (acetic acid) 和乙二胺四乙酸 (EDTA)组成的缓冲液],摇匀后放入微波炉中加热至透明液体状,加入 2 滴溴化乙锭 (EB) 染色剂,摇匀,倒入制胶板中,待胶板凝固后将其放置在水平电泳槽中,在第 1 个样孔中加入 8 μL Maker,按顺序依次加入 8 μL PCR 扩增产物,倒入缓冲液,电压设为 150 V,电泳 30 min 后取出凝胶于成像仪中,拍照并记录数据。

1.4 DNA 质量的测定方法

用 BioDrop 紫外分光光度计检测样品的 DNA 浓度和纯度。当样品 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  为 1.8 ~ 2.0 时,表明已达到所要求的纯度。当样品中含有蛋白质或苯酚等杂质时, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  发生改变。若  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} < 1.7$ ,说明蛋白质没有去除干净;若  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} > 2.0$ ,则表明 RNA 没有除干净或 DNA 已变性。

1.5 利用磁珠法所提取的 DNA 对高粱叶色性状基因定位的方法

用紫叶高粱 IS31557 (父本)与绿叶高粱 TX430 (母本)杂交获得 F<sub>1</sub> 代单株,再套袋自交获得 F<sub>2</sub> 代群体,观察性状分离情况。采取 F<sub>2</sub> 代群体中的隐性性状绿色植株叶片,用磁珠法快速提取 DNA,参考高粱基因组设计 49 对 SSR 引物,并筛选出 11 对稳定、清晰的多态性引物用于紫叶基因定位,引物序列见表 1。PCR 反应体系和扩增程序同“1.3.2”节。对亲本及隐性遗传群体进行 8% 聚丙烯凝胶电泳,经银染显色后,在胶片观察灯上查看结果。

通过 EMS 诱变获得高粱白条纹叶突变体植株,将白条纹叶突变体 WSL10 (母本)与绿叶高粱 TX430 (父本)杂交,获得杂交种 F<sub>1</sub> 代,再自交得到 F<sub>2</sub> 代群体,观察性状分离情况。分别提取高质量 F<sub>2</sub> 代分离群体中 30 株绿色植株和 30 株白条纹叶植株的 DNA,进行 BSA 混合池基因组测序。采集 F<sub>2</sub> 代群体中全部表现为隐性性状的白条纹叶植株的叶片,用磁珠法快速提取 DNA。参考高粱基因组设计 55 对 SSR 引物,其中 21 对多态性良好并用于白条纹叶基因定位 (表 2)。PCR 反应体系和扩增程序同“1.3.2”节。用 8% 聚丙烯凝胶进行电泳,经银染显色后,在胶片观察灯上查看结果。

最后用 Mapmaker 计算遗传距离,分别绘制高粱紫叶基因、白条纹叶基因遗传的连锁图谱。

表 1 用于紫叶高粱基因定位的 SSR 引物序列

引物名称	正向引物 F (5'→3')	反向引物 R (5'→3')
smr5746	GCGGACACTACGATGTGG	TGTATGATACTCTGTTGGAGG
smr5958	TGGAAGCACCACAAGACCC	CACGCTTTGCCAAGCTAATT
smr6057	CCCTAGCCTGATTACACG	ATTTCGACCAATTCCCTTG
smr6165	ACGACTCCCGACGGAACCA	ACTGATCGCCGCCCATTT
smr6197	AAAGAGCAAATAAGAGCA	GCATCACCTTGAATGTAG
smr6207	AAAACGTCATGTGGGATG	TTCTACCAAGCGGGATAA
smr6228	TTTTATCTTATTCGGTCAGG	CAAGCCTCCAATCACAAC
smr6242	GTTCGCCTCGGGAAGAAA	GCCGGATCAGCAACCATC
smr6244	TGAGACGGAGGGAGTAGT	CAGTTTGGTTCAAAAATCG
smr6260	AGCCAATCTATCACTTCA	ATCAAACACCTAGCAGGA
smr6340	ATTCAAGTATTGCTGGCTCG	GTGGATTTGTCCGCTCGT

2 结果与分析

2.1 不同部位和方法提取的 DNA 扩增结果

选取高粱嫩叶、老叶、根、茎、种子 5 种部位,通过 SDS 法、SDS + 2% PVP 法、CTAB 法、CTAB + 2%

PVP 法及磁珠法提取 DNA,获得的 PCR 扩增结果见图 1,其中 A、B、C、D、E 分别为嫩叶、老叶、根、茎、种子在 SSR 引物 RAD1 - 11、RAD2 - 6、RAD2 - 6、RAD2 - 6、RAD1 - 11 上的扩增结果。

表 2 用于白条纹叶高粱基因定位的 SSR 引物序列

引物名称	正向引物 F (5'→3')	反向引物 R (5'→3')
Y5404	AAGTGAGCAGCCTGGAGA	TTCAGTTGAGGTGGGACA
Y5605	TGATTGATTCTTGTTAC	AAATTGGGTGGATATGAT
Y5704	TATGTATCATTCTGGTCCTT	GTCCGTTACTTTCCCTTT
Y5770	GAGCAAAAGTTTCTCAGT	ACACTTACCAACTCTATCT
Y5795	GTCCATCCTGGCTTGTTA	GCTTGAGCAGCAGAAATA
Y5829	TCACGTTCTCCCGACTC	CCGCTGCTTCTTTCTCAA
Y5867	TGCGGCAGAACCTTACC	CCGACATCCTTCCGACAT
Y5870	CATACTATTTGACTCCTTGA	TCTCCGTCCTAATACAAT
Y58720	CGCAATAGTGTTCAAATC	TTGTATCAATGGCGGACT
Y5880	GTTAGGAGCGACGGAGTG	CGTAAATGCGAAATTGGAC
Y5881	GGGTGCAGTCGTGCATTCC	TGTGATTTCTGTCGTGTCGG
Y58820	CGCTTTGTGATTTGTGAGT	TTTAGATTCGATGAGGGA
Y5882	CCAGCACGACCAAGATAA	CACAGTTGTACCGAGGA
Y5884	CCGAAATCCATGAGTAAC	CTGAAATATCCAGCACAAA
Y5896	AGCGGTGAAATCAAAGCA	GCATCACGCCCTAACTCC
Y5899	CTTAACAAGCAAGGGATT	TCGTGCGATTTACAGACA
Y5900	CTAGATACTAAAAGCAAGA	AACTGAAAGAGTGGAAG
Y5963	TGTTGTGACATTCCGTCC	CTTACCTTTGTGGCTTTG
Y5964	GGCTGAGGGGTCACAAA	GAGGGAAGATGGAACACGA
Y6101	GGCATCTCCTTCCTTCTCC	GGTTGGGTACGGATGTGG
Y6103	ACCCATGAGATCGAGGAA	ATCGGACAAGCTAAGTGA

从图 1 - A 可以看出,用嫩叶提取的 DNA 进行 SSR 扩增,5 种方法均能提取出 DNA,且 PCR 扩增条带清晰,无拖带现象。从图 1 - B 可以看出,用老叶提取的 DNA 进行 PCR 扩增得到的条带以磁珠法的完整性最好、亮度清晰、均匀。从图 1 - C 可以看出,用根提取的 DNA 进行 SSR 扩增,以磁珠法最完好,其他方法的效果很差。从图 1 - D 可以看出,用高粱茎提取的 DNA 扩增均能成像但不够清晰,以磁珠法表现较好。由图 1 - E 可以看出,用高粱种子提取的 DNA 进行 SSR 扩增,除磁珠法外,其他方法所得带型的拖带现象均较严重。总之,无论材料取自哪种部位,磁珠法均可扩出清晰、明亮和完整的条带。

2.2 不同方法和部位提取 DNA 的时间和质量比较

本试验结果表明,不管选取高粱哪种部位,SDS 法、SDS + 2% PVP 法、CTAB 法和 CTAB + 2% PVP 法提取高粱组织 DNA 用时均需要 2 h,而采用磁珠法提取 DNA 的用时仅为 40 min,为其他方法的 1/3,由此说明磁珠法极大缩短了 DNA 的提取时间。更为重要的是,从 DNA 浓度 (ng/μL) 和  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$

来看,5 种不同方法提取的 DNA 质量差异明显 (表 3)。

从提取的 DNA 浓度和  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  来看,CTAB 法提取高粱嫩叶的浓度最大,但  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  低于 1.8,提取的 DNA 可能含有大量蛋白质和酚类物质;磁珠法提取高粱种子的 DNA 浓度最低,其  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  位于 1.8 ~ 2.0 之间,表明用该方法提取 DNA 中蛋白质、酚类物质和 RNA 的含量较低, DNA 提取质量较高。综合分析发现,SDS 法、SDS + 2% PVP 法、CTAB 法和 CTAB + 2% PVP 法提取高粱 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均存在大于 2.0 或小于 1.8 的情况;用磁珠法提取高粱 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均在 1.8 ~ 2.0 内,说明用这一方法可从高粱任何组织部位提取到高质量的 DNA。

2.3 磁珠法提取 DNA 在高粱叶色性状基因定位中的应用

2.3.1 在高粱紫叶性状基因定位中的应用 通过统计发现,紫叶高粱 IS31557 (父本) 与绿叶高粱 TX430 (母本) F<sub>2</sub> 代作图群体中的紫叶与绿叶植株数符合 3 : 1 的分离比,说明紫叶性状为显性遗传,

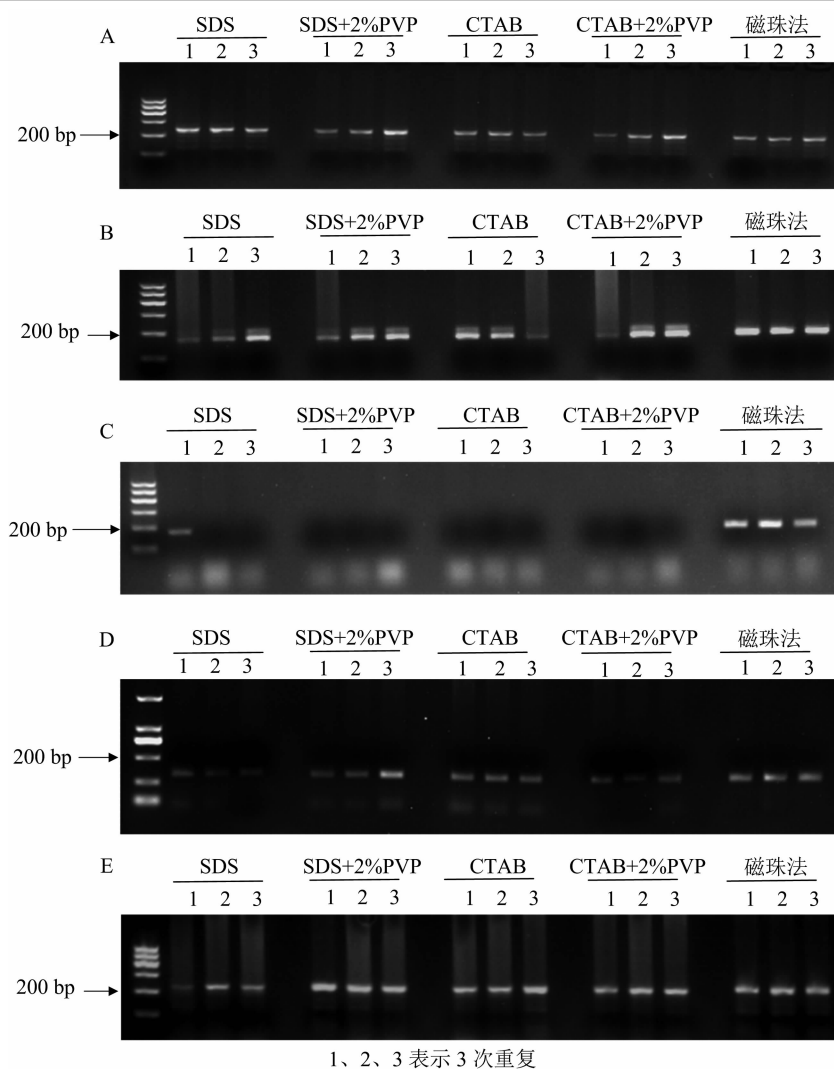


图1 用高粱嫩叶(A)、老叶(B)、根(C)、茎(D)、种子(E)提取 DNA 的 PCR 扩增结果

受 1 对等位基因控制。用磁珠法对高粱紫叶性状  $F_2$  代隐性遗传植株进行 DNA 提取,PCR 扩增结果的条带清晰,父母本性状分型明显,表明 DNA 满足 SSR 分子标记法对基因定位的鉴定。利用已公布的高粱分子图谱中的标记对 *PLI* 基因进行连锁分析,找出与其紧密连锁的分子标记,将基因 *PLI* 初步定位在 4 号染色体 SSR 标记 *smr6228* (62 280 555 bp) 和 *smr6244* (62 445 721 bp) 之间,基因与两侧标记的遗传距离分别为 1.8、4.0 cM (图 2)。

**2.3.2 在高粱白条纹叶基因定位中的应用** 对白条纹叶突变体 *WSL10* 与绿叶高粱 TX430 杂交构建的  $F_2$  群体中不同叶色性状植株进行统计,发现绿叶与白条纹叶植株数符合 3 : 1 的分离比,说明白条纹叶性状基因受 1 对隐性基因控制。通过 BSA 混合池基因组测序,将控制白条纹叶基因 *WSL10* 初步定位在 10 号染色体上。用筛选出的 21 对 SSR 标记对

$F_2$  代群体中的 210 株隐性白条纹叶性状进行验证,发现 *WSL10* 基因与 Y5870 标记 (58 706 511 bp) 紧密连锁,遗传距离为 1.0 cM (图 3)。

### 3 讨论

#### 3.1 高粱提取 DNA 的最优方法

植物组织细胞壁比较复杂,在提取 DNA 的过程中,多酚、多糖等杂质增加了提取难度,这就需要采取不同方法进行处理。王志龙等在提取滇池表层沉积物时发现,常规 CTAB 法、SDS 法操作较为繁琐,不能用于大量样品的提取<sup>[23]</sup>。谭小艳等改良了 4 种 CTAB 法提取石榴叶片 DNA,开展了几种方法 PCR 扩增和琼脂糖凝胶的验证,在 DNA 质量上有所提高,但其试验步骤繁琐,时间较长,且使用了三氯甲烷等有机溶剂,对人体有一定危害<sup>[24]</sup>;廖云蓉通过改良 SDS 法对银杏不同器官进行 DNA 提取,但

表 3 5 种方法提取 DNA 质量的比较

方法	部位	浓度 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$
SDS	嫩叶	1 631.70	1.705
	老叶	1 383.90	1.889
	根	692.90	1.928
	茎	897.90	1.984
	种子	1 030.50	2.028
SDS + 2% PVP	嫩叶	687.20	1.923
	老叶	831.70	1.882
	根	457.20	1.781
	茎	982.10	1.934
	种子	745.50	2.001
CTAB	嫩叶	1 942.90	1.698
	老叶	684.20	1.981
	根	384.00	1.957
	茎	753.50	2.017
	种子	997.60	2.007
CTAB + 2% PVP	嫩叶	550.20	1.986
	老叶	522.60	1.931
	根	353.90	1.951
	茎	740.80	2.021
	种子	568.10	1.997
磁珠法	嫩叶	414.70	1.856
	老叶	545.60	1.838
	根	450.30	1.928
	茎	403.63	1.846
	种子	268.40	1.944

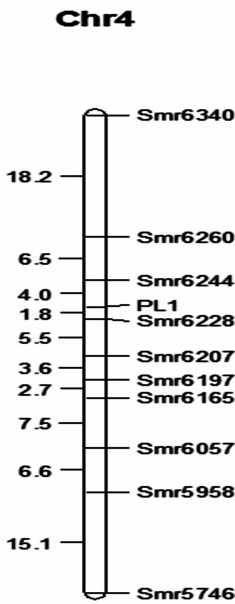


图2 高粱紫叶PL1基因在4号染色体定位区间的遗传结果

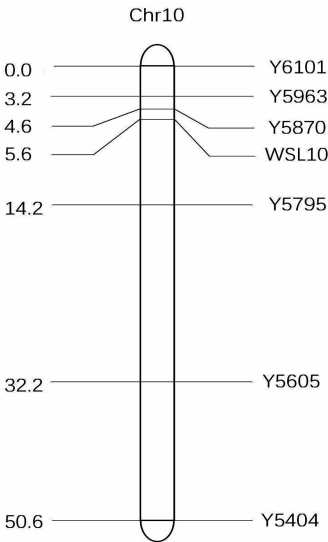


图3 高粱白条纹叶基因WSL10在第10染色体的遗传结果

只适用于嫩叶,其他部位提取的 DNA 杂质多、带弱、浓度低,不能满足基因组研究的要求<sup>[25]</sup>。王军等在提取新城疫病毒 DNA 时发现,磁珠法的提取过程省去了大量离心步骤,有效地节省了试验人员的时间,快速裂解液能代替有机溶剂,且成本低,无毒,安全可靠,不会在试验中对操作人员产生危害<sup>[26]</sup>。然而,以往利用磁珠法提取 DNA 大多局限于植物叶片,缺乏对植物多种部位的研究,尤其是尚未见用磁珠法提取高粱基因组 DNA 的报道。本研究发现,当用 SDS 法、CTAB 法提取高粱 DNA 时,若  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  小于 1.8,加入 2% PVP 能够有效去除提取物中的蛋白质、酚类物质,可以提高 DNA 质量;但是当  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  大于 2.0 时,加入 2% PVP 对提取高粱 DNA 质量无影响。然而,磁珠法能够在不加入 2% PVP 的情况下有效去除蛋白质、多酚和 RNA 杂质对提取 DNA 的干扰,并且可应用于高粱的多个部位,所提取的 DNA 质量优于其他方法,并且在高粱叶色性状基因定位上取得了理想的试验结果。

3.2 高粱提取 DNA 的最佳部位

从 PCR 扩增效果来看,用嫩叶提取的 DNA 质量最好,其次是老叶、种子和茎;由于根较硬,磨样耗时耗力,提取的质量、浓度较低,这也许是一些研究者采用叶片提取植物 DNA 的主要原因<sup>[24-25]</sup>。本研究发现,因提取方法不同,提取的 DNA 质量差异较大。若选取嫩叶,采用 SDS、CTAB 法提取 DNA,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  低于 1.8,表明 DNA 中蛋白质、酚类物质含量比较高;若选取老叶,无论采用哪种方法提取 DNA,其  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均在 1.8 ~ 2.0 之内;若选

取根,用 SDS + 2% PVP 法的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  低于 1.8,可能由于提取的 DNA 中蛋白质、酚类物质含量较高;若选取茎,用 CTAB 法、CTAB + 2% PVP 法提取的 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均大于 2.0,可能由于 RNA 含量较高;若选取种子,用 SDS 法、SDS + 2% PVP 法、CTAB 法提取的 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均超过 2.0,说明提取的 DNA 质量较差。但是,如果采用磁珠法,无论选取哪种部位, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均在 1.8 ~ 2.0 之间,表明提取的 DNA 中蛋白质、RNA 的含量少,符合基因定位的纯度要求。

### 3.3 高粱叶色基因定位的意义

叶色可用于分子标记辅助育种以培育新品种,还可将叶色标记与不育系相结合,根据叶色的明显差异去除不育系的自交种子,从而保证杂种的纯度,是解决雄性不育系不纯的一条有效途径<sup>[20]</sup>。本研究利用磁珠法分别提取了紫叶、白条纹叶群体的 DNA 进行遗传分析及基因定位,最终将紫叶基因 *PLI* 定位到 4 号染色体上,将白条纹叶基因 *WSL10* 定位在 10 号染色体上。虽然本研究定位的紫叶基因 *PLI* 和白条纹叶基因 *WSL10* 只是初定位,下一步尚待开展精细定位,但是本研究结果验证了磁珠法提取高质量 DNA 的意义,而且对于高粱分子标记辅助育种具有重要利用价值。

### 参考文献:

- [1] 张福耀,吴树彪,柳青山. 影响高粱饲用价值主要内在因素及其对策[J]. 动物营养学报,2016,28(1):1-8.
- [2] 李龙川. 甘肃省古浪县甜高粱产业发展的对策建议[J]. 畜牧兽医学杂志,2018,37(1):25-27.
- [3] 卢庆善,邹剑秋,朱凯,等. 试论我国高粱产业发展——论全国高粱生产优势区[J]. 杂粮作物,2009,29(2):78-80.
- [4] 林华春. 高粱种植与病虫害防治技术探究[J]. 广东蚕业,2021,55(6):63-64.
- [5] 周瑜,李泽碧,张亚勤,等. 主季种植密度和施氮量对高粱再生产量的影响[J]. 中国农业大学学报,2021,26(8):43-53.
- [6] 何振富,贺春贵,陈平,等. 不同甜高粱品种(系)农艺性状与产量、品质的相关性研究[J]. 中国饲料,2021(13):84-91.
- [7] Wang L H, Liu Y L, Gao L, et al. Identification of candidate forage yield genes in *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L.) using integrated genome-wide association studies and RNA-Seq[J]. Frontiers in Plant Science,2022,12:788433.
- [8] 山仓,徐炳成. 论高粱的抗旱性及在旱区农业中的地位[J]. 中国农业科学,2009,42(7):2342-2348.
- [9] 杨玲,袁辉,郭旭凯,等. 高粱酚类化合物研究进展[J]. 东北农业科学,2022,47(3):138-141,149.
- [10] Rayaprolu L, Selvanayagam S, Rao D M, et al. Genome-wide association study for major biofuel traits in sorghum using minicore collection[J]. Protein and Peptide Letters,2021,28(8):909-928.
- [11] 王春语,李政君,陈冰嫒,等. 分子标记鉴定 EMS 诱变高粱突变体的真伪[J]. 辽宁农业科学,2021(3):1-7.
- [12] 邵玉涛,刘丹,郭磊,等. 高粱病程相关蛋白基因的鉴定及荧光定量 PCR 引物筛选[J]. 分子植物育种,2020,18(19):6392-6398.
- [13] 李海燕. “能饲一号”甜高粱 BIBAC 文库的构建与分析[D]. 武汉:华中农业大学,2013:2-4.
- [14] 吴国芳,于肖夏,于卓,等. 基于 BSA-SSR 技术的高丹草低氢氰酸性状目的片段的筛选与鉴定[J]. 草业学报,2021,30(7):82-92.
- [15] 高建明,夏卜咸,杨洪,等. 4 种高粱基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. 安徽农业科学,2011,39(23):13942-13943,13946.
- [16] 郑卓,李健,圣忠华,等. 高粱总 DNA 不同提取方法的比较[J]. 安徽农业科学,2007,35(36):11758-11759.
- [17] 赵宇璇,刘真真,常双锋,等. 胡萝卜叶色突变体叶色参数和色素含量及其相关性分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(4):100-104.
- [18] 杨颜榕,黄纤纤,赵亚男,等. 水稻叶色基因克隆与分子机制研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2020,21(4):794-803.
- [19] 任永梅,王嘉宇,王琬璐,等. 水稻白条纹叶突变体 *ws11* 的生理特性分析及基因定位[J]. 沈阳农业大学学报,2019,50(1):87-92.
- [20] 金怡,刘合芹,汪得凯,等. 一个水稻苗期白条纹叶及抽穗期白穗突变体的鉴定和基因定位[J]. 中国水稻科学,2011,25(5):461-466.
- [21] 张磊,曹德美,胡建军. 植物叶色形成调控机制研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2021,22(2):293-303.
- [22] 李杰勤,王丽华,詹秋文,等. 高粱棕色中脉基因 *bmr-6* 的遗传分析和 SSR 标记定位[J]. 草业学报,2010,19(5):273-277.
- [23] 王志龙,李春筱,蔡一鸣,等. 不同 DNA 提取方法对高通量测序检测沉积物微生物多样性的影响[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版),2021,46(5):89-99.
- [24] 谭小艳,马耀华,郝兆祥. 4 种改良 CTAB 法提取石榴成熟叶片 DNA 的比较研究[J]. 中国南方果树,2021,50(3):122-125.
- [25] 廖云蓉. 使用改良的 SDS 法提取银杏不同器官 DNA 的研究[J]. 现代园艺,2012(11):5,78.
- [26] 王军,何长生,王维,等. 磁珠法和柱式法提取核酸在新城疫荧光定量检测中的比较[J]. 中国动物保健,2021,23(3):98,100.