

桃褐腐病菌孢子破壁及 DNA 提取方法研究

刘 海 席¹, 葛 喜 珍², 田 平 芳¹

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学 生物化学工程学院, 北京 100023)

摘 要: 采用超声破碎法和反复冻融法对桃褐腐病菌孢子进行破壁, 镜检结果发现超声破碎法优于反复冻融法, 超声破碎条件为: 超声 3 s, 间隔 2 s, 频率为 99 次, 功率 500 W, 重复 2 次。此外, 比较了用氯化苄法、液氮冷冻法和酸洗玻璃珠法提取的基因组 DNA, 发现氯化苄法效果较好。该方法以 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 与 40 mM EDTA, pH 8.0 的混合液为提取缓冲液, 使氯化苄在碱性条件下与桃褐腐病菌的多糖成分发生反应, 从而破坏细胞壁结构, 证明是一种简便快速提取桃褐腐病菌 DNA 的有效方法。

关键词: 桃褐腐病菌; 超声破碎法; 氯化苄; DNA 提取

中图分类号: Q 943.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)05-0141-03

真菌细胞壁主要为几丁质和糖蛋白, 与细菌和酵母菌相比, 它含有几丁质或纤维素等纤维状结构, 壁厚, 坚韧, 因此破壁难度较大。细菌破壁方法并不适于真菌。真菌破壁方法^[1]分为机械法和非机械法。桃褐腐菌(*Monilinia fructicola*)是一种典型的子囊真菌, 主要侵染桃树的花、叶、枝及果实, 尤以果实受害最重。该病在欧美、新西兰及中国均广泛发生, 造成巨大经济损失。由于近年来抗药性菌株不断产生, 故迫切需要建立快速的检测方法。由于细胞破壁和核酸提取是分子检测的前提, 为此该研究尝试用超声破碎和反复冻融法^[2]进行孢子破壁, 发现超声破碎优于反复冻融法。分别用氯化苄法^[3]、液氮冷冻法和酸洗玻璃珠法提取基因组 DNA, 发现氯化苄法较好。该研究为其快速检测建立了有效方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

桃褐腐病菌由北京市农科院植保所提供。孢子悬浮液的制备: 将桃褐腐病菌接种在 PDA 培养基上, 27℃培养 5~7 d, 用无菌水配制孢子悬浮液。氯化苄为北京市兴津化工厂产品。氯化苄提取缓冲液: 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 40 mM EDTA pH 8.0, 10% SDS; 3 M NaAc(pH 5.2); 液氮提取缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2% SDS, 2% 2-巯基乙醇(pH 8.0); 酸洗玻璃珠裂解缓冲液: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM

NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0); TE 缓冲液。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子破壁 采用超声破碎和反复冻融法进行破壁, 用光学显微镜检查孢子。超声破碎法: 将孢子悬浮液进行超声破碎, 超声条件为: 超声 3 s, 间隔 2 s, 频率 99 次, 功率为 500 W, 次数 2 次。反复冻融法: 将孢子悬浮液先在冰箱内冷冻 30 min, 再用水浴煮沸 30 min, 反复进行 3 次。将这些孢子 13 000 r/min 离心 10 min, 取离心管底部孢子在光学显微镜下检查破壁情况。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 氯化苄法: ①取孢子悬浮液加到 PDB 培养基中, 27℃, 150 r/min 摇床培养 48 h, 用纱布过滤, 用滤纸吸干菌丝体水分。②向菌丝加入 100 μL 提取缓冲液, 冰上研磨, 再加 400 μL 50℃预热的提取缓冲液, 剧烈震荡使之混匀, 加入 100 μL 10% SDS, 300 μL 氯化苄, 剧烈震荡使呈乳状, 50℃保温 1 h, 每隔 10 min 震荡混匀 1 次, 然后加入 300 μL 3 M NaAc(pH 5.2), 冰浴 15 min, 4℃下 12 000 r/min 离心 10 min, 留上清液。③加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 轻轻颠倒混匀, 12 000 r/min 4℃离心 10 min, 重复抽提 2 次, 取上清, 加入等体积异戊醇, 室温沉淀 20 min, 12 000 r/min 4℃离心 10 min, 留沉淀。④用 70%乙醇洗涤 2 次, 再用无水乙醇洗涤, 自然晾干, 加入 50 μL TE 缓冲液溶解, 加 RNase 消化, -20℃保存。液氮冷冻法: ①收集培养的菌丝体, 液氮中冷冻研磨, 将捣碎后的粉末加入到 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μL 缓冲液, 65℃静置 1 h。②加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 轻轻颠倒混匀, 13 000 r/min 4℃离心 5 min。③取上清液加入等体积异丙醇和 50 μL 的 3 mol/L 的 NaAc(pH 5.2), 冰箱内冷冻 30 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀。④用 70%乙

第一作者简介: 刘海席(1984), 女, 硕士, 现主要从事生物农药研究工作。

通讯作者: 田平芳(1965-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事分子植物病理学研究工作。

收稿日期: 2009-12-02

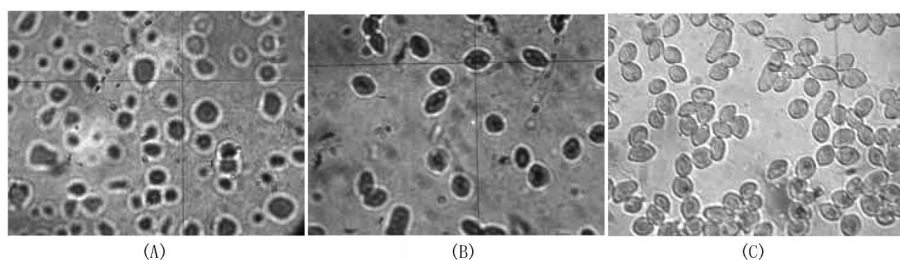
醇洗涤沉淀, 自然晾干后加入 50 μL 的 TE 缓冲液溶解过夜。加入 RNase 消化, -20°C 冰箱内保存。酸洗玻璃珠法: ①收集培养的菌丝体, 加入到 200 μL 裂解缓冲液中, 然后加入约 300 μL 玻璃珠和 200 μL 的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混合液, 漩涡震荡 5 min。②加入约 200 μL 的 TE 缓冲液, 倒置混合 6~10 次, 13 000 r/min 离心 5 min。③将上层水相转移到干净的离心管中, 加入 1 倍体积氯仿并颠倒混合, 13 000 r/min 离心 5 min。④将上层水相转移到新的离心管中, 加入 1 mL 无水乙醇离心洗涤, 再用 70%乙醇洗涤。⑤弃上清液, 将沉淀在室温下自然晾干, 用适量 TE 缓冲液溶解沉淀。加入

RNase 消化, -20°C 冰箱内保存。

2 结果与分析

2.1 2 种破壁方法的显微形态分析

用超声破碎法和反复冻融法分别对孢子进行破壁试验, 在光学显微镜下放大 400 倍观察孢子破壁情况。由图 1 可知, 与对照相比, 超声破碎法处理的孢子壁大部分破裂, 孢子大小不一, 个别孢子还发生变形并有空泡现象; 而经反复冻融法处理的孢子细胞壁破裂程度较轻, 且极少个孢子发生变形, 破壁效果不明显, 因此选择超声破碎法对孢子进行破壁。



(A) 超声破碎法

(B) 反复冻融法

(C) 空白对照

图 1 超声破碎法和反复冻融法对孢子破壁的比较

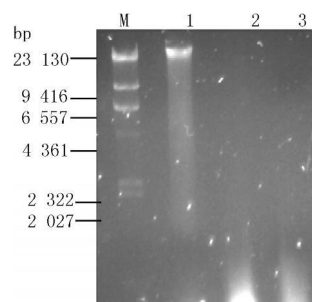


图 2 基因组 DNA 提取电泳图

注: M: 标准分子量; 1: 氯化苄法

2: 液氮冷冻法; 3: 酸洗玻璃珠法。

2.2 3 种提取基因组 DNA 的电泳结果比较

将上述 3 种方法提取的 DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 $\lambda\text{DNA}/\text{HindII}$ 为分子量标记, 以花青素为染料, 观察照相(见图 2)。由图 2 可知, 氯化苄法提取的基因组 DNA 浓度较高, 虽有轻度拖尾, 但是不影响后期使用。而液氮冷冻法和酸洗玻璃珠法的提取结果失败, 且杂质较多。氯化苄法是通过氯化苄在碱性条件下与细胞壁多糖成分发生化学反应, 从而破坏真菌细胞壁, 而液氮冷冻和酸洗玻璃珠法则分别通过反复冻融和物理研磨来破坏真菌细胞壁, 可见氯化苄法适于桃褐腐菌基因组 DNA 的提取, 该方法快速、简便, DNA 质量好。

3 讨论

桃褐腐病菌是丝状真菌, 细胞壁主要为多糖, 其次是蛋白质和类脂, 胞壁致密坚实。该试验利用强烈超声波破碎孢子细胞壁, 并与反复冻融法比较, 发现超声破碎法明显优于反复冻融法。超声波的主要作用有热效应、空化效应和机械效应。热效应是超声在介质中传播时, 由于受摩擦力阻碍而引起分子震动, 从而使部分能量转化为局部高热。空化效应是在超声条件下, 细胞内产生空泡, 随着空泡震动和其猛烈聚爆而形成机械剪切压力。机械效应则是超声的原发效应, 即超声波在传播中介质质点交替压缩与伸张构成的压力变化。该试验

中, 上述后 2 种效应是导致孢子破碎的主因。反复冻融法是通过水结晶的形成和融化而使细胞破碎, 该方法较超声破碎法温和, 不能充分破碎细胞壁。目前对桃褐腐病菌的遗传多样性、抗药性的分子检测越来越多^[4-5], 而进行这些检测的一个关键步骤就是提取高质量的 DNA。该研究采用 3 种方法提取基因组 DNA, 发现氯化苄法效果较好。氯化苄在碱性条件下可与细胞壁多糖上的羟基反应形成醚, 使多糖长链断裂而破坏细胞壁, 胞内 DNA 释放出来。氯化苄价格便宜, 毒性小, 因此该方法是提取桃褐腐病菌 DNA 的有效方法。

参考文献

- [1] 万其兵, 刘丽丽, 杨秀英. 真菌细胞破壁方法的研究[J]. 天津师范大学学报, 2004, 24(4): 38-40.
- [2] 王雪青, 苗惠, 翟燕. 微藻细胞破碎方法的研究[J]. 天津科技大学学报, 2007, 22(1): 21-25.
- [3] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Res, 1993(21): 5279-5280.
- [4] Ma Z, Yoshimura M A, Michailides T J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchard in California[J]. Appl Envir Micro, 2003, 69(12): 7145-7152.
- [5] Forster H, Adaskaveg J E. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by monilinia specific DNA primers[J]. Phytopathology, 2000, 90(2): 171-178.

丰花月季‘美神’组织培养研究

蔺红苹, 吴飞凤

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘 要: 试验以丰花月季‘美神’带腋芽茎段为外植体进行离体技术研究。结果表明: 以枝条中部的腋芽为外植体进行组织培养效果最好, 在 8 d 内可萌发, 芽长势好; 在进行继代培养时, 摘心对嫩茎有较大的促进作用, 可促使芽快速长高和长粗; 利用含不同浓度 NAA 进行培养诱导生根时, 最适浓度为 0.1~0.5 mg/L, 芽高度为 2.0~3.5 cm 时最有利于其生根, 生根率达 91%, 且根系发达。

关键词: 丰花月季; 茎段培养; NAA

中图分类号: S 685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)05-0143-03

月季是蔷薇科蔷薇属木本植物, 又名四季蔷薇, 原产于中国^[1], 是近代风靡世界的名花, 素有“花中皇后”之美誉^[2], 深受人们的喜爱, 成为切花的四大支柱之一。月季种类繁多, 丰花月季因其花头成聚状, 又称聚花月季^[3]。它具有耐寒、耐高温、抗旱、抗涝、抗病^[4]的特点, 对环境适应性极强; 每年多次开花, 花期长, 花径略小, 成束开放, 花色多样, 芳香怡人。因此既适合园林和路带绿化, 也宜于盆栽美化庭院居室, 是城市绿化和美化的上等佳品^[5]。

由于丰花月季为木本植物, 生长繁殖速度较慢, 受插穗量及其繁殖技术的限制而不能进行大批量繁殖和

应用。利用组织培养技术, 对丰花月季(*Rosa hybrida*) ‘美神’进行研究, 可大大缩短其增殖周期, 提高其繁殖系数, 能达到大批量生产和应用, 对加速新品种的推广和运用起到了积极作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选自湛江师范学院植物园内当年生丰花月季‘美神’健壮优良母株上未开花枝条。

1.2 试验方法

1.2.1 不同茎段腋芽诱导 将选取的外植体剪去叶片、叶柄, 用自来水冲洗干净, 将其剪成 3 段: 顶端 1~3 节、顶端以下 4~8 节^[6]和顶端以下 9~13 节各为 1 段。加入 0.1% 的升汞溶液消毒 10 min, 用无菌水清洗 3~4 次, 再转入 1%~1.5% 的次氯酸钠溶液中浸泡 8 min, 用无菌水冲洗 5 次。用手术刀将各段切成约

第一作者简介: 蔺红苹(1979-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为组织培养及病理研究。E-mail: yuzaidongji@yahoo.com.cn.
收稿日期: 2009-12-20

Methods of Breaking Spore Wall of *Monilinia fructicola* and DNA Extraction

LIU Hai-xi¹, GE Xi-zhen², TIAN Ping-fang¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029; 2. Bioengineering College of Beijing Union University, Beijing 100023)

Abstract: Ultrasonic method and repetitive freezing-thawing were employed to break the spore wall of *Monilinia fructicola*, ultrasonic method was found to be superior to repetitive freezing-thawing method. The ultrasonication conditions comprise ultrasonic of 3 s, interval of 2 s, frequency of 99 times, power of 500 W, and treated twice. To select appropriate methods for extracting genomic DNA, we compared benzyl chloride method, liquid nitrogen refrigeration and glass bead method, benzyl chloride method appeared to be the best. In this method, the mixture of 100mM Tris-HCl at pH 9.0 and 40 mM EDTA at pH 8.0 was chosen as the buffer, which enabled benzyl chloride under alkalinity condition to react with polysaccharide in spore wall of *M. fructicola* and therefore destroyed the cell wall. This method is simple, rapid and efficient for DNA extraction.

Key words: *Monilinia fructicola*; ultrasonic method; benzyl chloride; DNA extraction