

不同方法提取野生荔枝基因组 DNA 效果的比较

刘 锴 栋, 袁 长 春, 陈 燕, 莫 秋 梅, 黎 海 利

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘 要:以广东、广西地区的 3 个野生龙眼的幼嫩叶片为试材, 采用 SDS 法、常规 CTAB 法和改良 2×CTAB 法提取荔枝叶片基因组 DNA, 比较研究从富含多酚、多糖和色素等次生代谢物质的野生荔枝叶片中获得高质量 DNA 的提取方法。结果表明: 采用改良的 2×CTAB 法提取的荔枝叶片基因组 DNA 纯度最高、质量最佳, 可直接用于荔枝叶绿体 DNA *trnL-F* 基因的 PCR 扩增分析, 且扩增后条带清晰。表明改良的 2×CTAB 方法获得的 DNA 纯度和产率较高, 符合进行野生分子标记的实验要求。

关键词:野生荔枝; 基因组 DNA; SDS 法; CTAB 法

中图分类号:S 667.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0105-05

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.) 属无患子科荔枝属植物, 为亚热带常绿乔木。荔枝原产于我国南部, 是我国岭南佳果, 因其色、香、味皆美, 均为国内外人士所喜爱, 而被称为“中华之珍品”^[1]。

作为遗传信息载体的 DNA 分子, 是最重要的生物信息分子^[2]。提取高质量的 DNA 分子是对植物基因组进行分子生物学如分子杂交、分子标记辅助育种、图谱构建、基因定位、基因克隆、遗传转化和遗传多样性分析等领域^[3-4]研究的重要基础。因此, 能否快速并且成功提取植物基因组 DNA 以及所提取基因组 DNA 的质量的高低将直接关系到整个试验的成败。到目前为止, 国内外对于植物基因组 DNA 的提取已经有不少的研究, 并且在很多文献中都有报道^[5]。目前常用的 DNA 提取方法有十二烷基硫酸钠(SDS)^[6-7]法、十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)^[8-9]法、高盐低 pH 法^[10]、碱裂法、苯酚法、热解法、试剂盒提取 DNA 的方法等^[11]。

野生荔枝叶片细胞内的多糖、酚类、色素及蛋白质等次生物质的含量较高而使材料在 DNA 提取过程中很容易发生褐变, 致使所提取的 DNA 质量不高。因此, 是

否能提取到高质量的野生荔枝基因组 DNA 直接影响到野生荔枝相关分子生物学研究。为此, 该试验旨在通过 3 种常用的 DNA 提取方法-SDS 法、常规 CTAB 法、改良的 2×CTAB 法, 以干燥的野生荔枝幼嫩叶片为试材, 分别进行荔枝叶片基因组 DNA 的提取并对所提取的基因组 DNA 的质量进行比较分析, 以期寻找到一种简便、快捷而又经济的高质量荔枝叶片基因组 DNA 提取的方法, 为进一步开展野生荔枝分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集新鲜、无病虫害的 3 种野生荔枝幼嫩叶片(分别取自广东湛江廉江谢鞋山野生荔枝保护区和广西玉林市), 以保鲜薄膜袋分装后加入硅胶吸收水分, 放室温干燥保存备用。

试剂:SDS 细胞提取液(pH 8.0)(100 mmol/L 的 Tris-HCl、5 mmol/L 的 EDTA、500 mmol/L 的 NaCl、1.25% SDS、1 mL 的 β-巯基乙醇); 常规 CTAB 提取缓冲液(500 mmol/L NaCl、50 mmol/L pH 8.0 的 EDTA、100 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl、2% CTAB); 改良 2×CTAB(100 mmol/L 的 Tris (pH 8.0)、1.4 mol/L 的 NaCl、25 mmol/L 的 EDTA、2% CTAB); 氯仿-异戊醇(V: V=24: 1); 酚-氯仿; 氯仿; 3 mol/L NaAc; 5 mol/L 的 KCl; 70%乙醇; 异丙醇; 无水乙醇; β-巯基乙醇; TE 缓冲液; 1×TAE 溶液; RNase; GV 核酸染料(北京赛百盛); 10×Buffer; Marker(北京鼎国); Taq DNA 聚合酶(北京源晨生物公司); dNTPs(上海生工); 引物 C(上海生工); 引物 F(上海生工)。

仪器:台式高速离心机(TG16A-WS 型, 湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司); 紫外分析仪(WD-9403 型, 北

第一作者简介:刘锴栋(1982-), 男, 广东电白人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: liukaidong2001@126.com.

责任作者:袁长春(1964-), 男, 湖南常德人, 博士, 教授, 研究方向为植物分子系统学与分子遗传学。E-mail: yuanchangchun@yahoo.com.

基金项目:广东高校优秀青年创新人才培养计划资助项目(LYM11087); 广东省科技计划资助项目(2008B020300001); 湛江市科技攻关计划资助项目(2011C3106019, 2012C3102019); 湛江师范学院青年科研基金资助项目(QL0911)。

收稿日期:2012-08-22

京);紫外可见分光光度计(UV-2600 型,上海);微量移液器(Eppendorf,德国);立式压力蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-75SII 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂);稳压稳流电泳仪(DYY-5 型,北京六一仪器厂);凝胶成像分析系统(UVP GDS-8000pc,美国);电热恒温水浴槽(DK-8D 型,上海精宏实验设备有限公司);PCR 扩增仪(MC96G,杭州)。

1.2 试验方法

1.2.1 SDS 法提取 DNA (1)称取荔枝干叶约 0.6 g,在液氮中研磨成粉末状(越细越好)。(2)转移至 50 mL 离心管中,加入 8 mL 细胞提取液,充分混匀。65℃水浴保温 20 min。(3)从水浴中取出离心管,加入 2.5 mL 5 mol/L KCl 溶液,混匀,水浴 20 min。(4)4 000 r/min 离心 20 min。(5)将上清液转移到另 1 个 50 mL 离心管中。(6)加等体积酚/氯仿混匀,12 000 r/min,离心 5 min,取上清液。(7)加等体积氯仿,混匀,12 000 r/min,离心 5 min,取上清液。(8)加入 0.6~1 倍体积的异丙醇(沉淀 DNA),混匀。(9)离心获得沉淀,70%乙醇洗 3 次。干燥沉淀(不要太干,否则 DNA 不易溶解)。(10)加入 200 μ L TE 缓冲液,溶解 DNA,置-20℃保存。

1.2.2 常规 CTAB 法提取 DNA (1)称取荔枝干叶 0.6 g,在灭菌的研钵中加液氮迅速研磨成粉末状。(2)将粉末近等量地分装于 4 个 1.5 mL 的微量离心管中,加入常规 CTAB 提取缓冲液 1 mL,摇晃几次,在 65℃水浴锅中温浴 2 h,每隔 10 min 轻轻摇晃数次。(3)在常温下以 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液转入另 1 个 1.5 mL 离心管中。(4)加入等体积氯仿/异戊醇(V:V=24:1)轻轻摇晃数次,在常温下以 10 000 r/min 离心 10 min。(5)重复步骤(4)1 次。(6)加入 2 倍体积-20℃预冷的无水乙醇和 1/10 体积的 NaAc(pH 5.2)沉淀,在 4℃下以 5 000 r/min 离心 4 min。(7)倒出无水乙醇,加入 70%乙醇,将沉淀弹起,在 4℃下以 5 000 r/min 离心 4 min。(8)重复步骤(7)1 次。(9)倒出 70%乙醇,将离心管倒置于吸水纸上,自然风干。(10)加 800 μ L 的 TE 于沉淀中使其完全溶解。(11)加入 15 μ L 10 μ g/mL 的 RNase,37℃水浴 3 h 以上至过夜。(12)加入等体积氯仿/异戊醇(V:V=24:1),10 000 r/min 离心 10 min,重复 1 次,吸取上清液。(13)同步骤(5)~(9)。(14)自然风干,溶于 50~100 μ L 的 TE 缓冲液中,置于-20℃冰箱保存^[12]。

1.2.3 改进后的 2×CTAB 法提取 DNA CTAB 是一种去污剂,它能跟核酸形成复合物,这些复合物在高盐溶液(0.7 mol/L NaCl)中可溶,并且稳定存在,但如果减低盐的浓度(0.5 mol/L NaCl),CTAB 与核酸的复合物就会因溶解度降低而沉淀出来。而大部分的蛋白及多糖仍溶于溶液中。通过离心将 CTAB-核酸沉淀下来,然

后溶于高盐溶液中。具体按下列步骤进行:(1)称取荔枝干叶约 0.6 g,置于干净灭菌的瓷研钵中,剪成小片,加液氮充分研磨成细粉,约 10 min,自制粉末呈浅灰绿色。(2)磨碎的粉末近等量地分装于 4 个 1.5 mL 的微量离心管中,分别加入 1 mL 预热(约 50℃)的改良 2×CTAB 缓冲液[含 2% (w/v) CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma), 1.4 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L Na₂S₂O₃,使用前加入 0.2% (v/v) β -巯基乙醇和 0.4% PVP],用力摇匀。(3)60℃保温 2 h,每隔 10~15 min 摇匀 1 次。然后室温放置 15 min,其间摇动 1~2 次。(4)10 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀,取上清液移至新管,加氯仿-异戊醇(V:V=24:1)至满管,用力摇匀。(5)10 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液移至新管,加氯仿-异戊醇(V:V=24:1)至满管,用力摇匀。(6)10 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液,先加 1/10 体积预冷(4℃)的 3 mol/L NaAc,再加预冷(4℃)的异丙醇至满管,将离心管轻轻翻转几次(约 5 s),-20℃放置 2 h 以上或过夜。(7)10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀用 70%乙醇洗脱 2 次,再用无水乙醇洗脱 1 次。晾干(或用灭菌过的滤纸吸干)后,加 50~100 μ L TE 缓冲液溶解,加入 20 μ L RNase(10 mg/mL),置-20℃保存^[13-14]。

1.2.4 DNA 质量的检测 DNA 样品纯度的检测:用紫外分光光度计法检测。以 TE 缓冲液作为空白对照,测定 3 种不同方法提取荔枝叶片基因组 DNA 样品在波长 260、280 nm 处的 OD 值,并根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值判断 DNA 的纯度。琼脂糖凝胶电泳检测:采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量高低是一种很常见的检测方法。取荔枝总 DNA 5 μ L,与 6×Loading buffer 混匀后点样于 ρ =1%且含有 GV 核酸染料的琼脂糖凝胶,在 1×TAE 缓冲液,稳流 80 mA 下电泳,电泳约 40 min 后在紫外光下观察电泳结果并照相。

1.2.5 叶绿体 DNA *trnL-F* 基因 PCR 扩增及扩增产物电泳检测 叶绿体 DNA(cpDNA) *trnL-F* 基因目前运用到分子系统学上的常用的 DNA 序列。扩增引物包括 C:5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'; F:5'-ATTT-GAACTGGTGACACGAG-3'。25 μ L 反应体系:PCR Loading buffer 2.5 μ L, dNTP mixture 2.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 U,取 0.4 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L,引物 C 1.0 μ L,引物 F 1.0 μ L,用 ddH₂O 补充至 25 μ L。扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min, 52℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。扩增完成后,取 10 μ L 样品与 2 μ L 上样缓冲液混匀点样,100 V 电泳,照相。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 样品的纯度分析

用紫外分光光度法测定 DNA 的纯度时,如果 DNA 溶液是纯净的,其 $OD_{260}/OD_{280}=1.80$ 。一般情况下,所提取的植物基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值大于 1.80 且小于 1.90 时,说明该 DNA 样品受杂质污染最少,质量最佳。若 $OD_{260}/OD_{280}>1.80$,表明 DNA 样品可能受到少量 RNA 的污染,此时可以用 RNase 对样品进行重新处理;如果其比值大于 1.90,则说明 DNA 样品有可能出现断裂现象^[15]。因此,在 DNA 提取过程中,操作动作应尽可能轻柔,从而减少外力作用对 DNA 完整性的破坏。当 $OD_{260}/OD_{280}<1.60$ 时,表明样品中可能存在一定量的蛋白质或混有酚类物质等。针对这种情况,可对样品进行重新抽提以进一步把蛋白质以及酚类等去除干净。将不同提取方法对不同品种荔枝叶片总 DNA 在紫外分光光度检测数据见表 1。用 SDS 法提取到的 3 个野生荔枝总 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.89~2.17 之间,其 OD_{260}/OD_{280} 值出现最高值,由此可以看出,用该方法得到的 DNA 样品可能受较多 RNA 的污染以及其 DNA 有可能发生较严重的断裂现象。常规 CTAB 法提取的荔枝基因组 DNA,其 OD_{260}/OD_{280} 值介于 1.55~1.71,表明其 DNA 样品中可能存在一定量的蛋白质或混有酚类物质等。采用改良的 2×CTAB 法提取的总 DNA,其 OD_{260}/OD_{280} 的比值为 1.81~1.84,大于 1.80 且小于 1.90,可见其 DNA 样品中的蛋白质以及酚类等去除充分,较好地避免了 RNA 的污染。总的来说,用该方法所提取的 DNA 纯度高,受损程度较低,可以很好的满足试验要求,为野生荔枝的分子生物学研究奠定了基础。

表 1 3 种方法从 3 个品种荔枝中
提取的总 DNA 的纯度

| 方法 | 样品 | OD_{260} | OD_{280} | OD_{260}/OD_{280} |
|-------------|--------|------------|------------|---------------------|
| SDS 法 | 廉江野生 1 | 0.471 | 0.249 | 1.89 |
| | 廉江野生 2 | 0.404 | 0.186 | 2.17 |
| | 玉林野生 1 | 0.334 | 0.171 | 1.95 |
| 常规 CTAB 法 | 廉江野生 1 | 0.409 | 0.264 | 1.55 |
| | 廉江野生 2 | 0.268 | 0.169 | 1.59 |
| | 玉林野生 1 | 0.391 | 0.228 | 1.71 |
| 改良 2×CTAB 法 | 廉江野生 1 | 0.416 | 0.227 | 1.83 |
| | 廉江野生 2 | 0.391 | 0.216 | 1.81 |
| | 玉林野生 1 | 0.309 | 0.168 | 1.84 |

2.2 3 种方法提取的总 DNA 电泳检测分析

对 3 种不同方法提取不同品种荔枝叶片基因组 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果如图 1~3 所示。用改良 2×CTAB 法提取的荔枝基因组 DNA 在凝胶上为一条清晰完整的带,说明用该方法提取的荔枝 DNA 纯度高,少降解,完整性较好;点样孔较清晰可见,

表明其残留物少,基本可以排除 DNA 样品中蛋白质以及多酚等杂质的污染。但用 SDS 法和常规 CTAB 法提取的荔枝基因组 DNA 谱带则不清晰或不明显,还出现较严重的拖尾现象,部分点样孔也比较模糊,说明采用这 2 种方法提取到的 DNA 浓度较低,所提出的 DNA 也有较多的杂质干扰。因此,对于富含多糖、多酚、多色素等次生代谢物质的多年生木本植物野生荔枝来说,用改良的 2×CTAB 法提取其叶片基因组 DNA 获得了比较满意的结果。因此,改良的 2×CTAB 法是提取野生荔枝叶片基因组 DNA 的较理想方法。

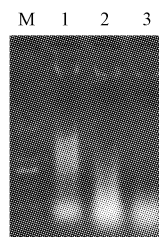


图 1 SDS 法提取荔枝总 DNA 的电泳图谱

注:1;廉江野生 1;2;廉江野生 2;3;玉林野生 1;M;Marker。下同。

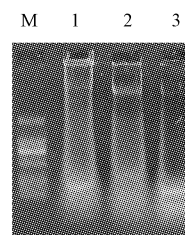


图 2 常规 CTAB 法提取荔枝总 DNA 的电泳图谱

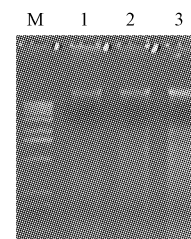


图 3 改良 CTAB 法提取荔枝总 DNA 的电泳图谱

2.3 改良的 2×CTAB 法提取荔枝基因组 DNA 的 PCR 扩增分析

改良的 2×CTAB 法提取荔枝基因组 DNA 的 cpDNA *trnL-F* 基因扩增结果见图 4。在特定的引物、合适的模板浓度、聚合酶等条件下,对荔枝总 DNA 的 cpDNA *trnL-F* 基因进行 PCR 扩增。从 PCR 扩增产物电泳结果图上可以看出,改良的 2×CTAB 法提取荔枝叶片基因组 DNA 在进行 cpDNA *trnL-F* 基因 PCR 扩增上效果良好。其扩增出来的条带单一,亮度较亮,说明其扩增效果好,用该方法提取的荔枝 DNA 可直接用于 cpDNA *trnL-F* 基因的扩增。

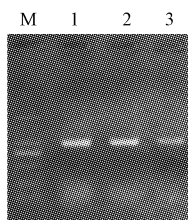


图4 改良 2×CTAB 法提取的荔枝 DNA 的 cpDNA *trnL-F* 基因扩增电泳结果图

3 讨论

该试验所采用的 3 种 DNA 提取方法中,通过对其所提取 DNA 质量的分析比较,SDS 法与常规 CTAB 法均不能很好用于野生荔枝叶片基因组 DNA 的提取,这与易干军等^[16]指出 SDS 法和传统 CTAB 法不适宜荔枝 DNA 提取的观点相符。采用改良的 2×CTAB 法提取的野生荔枝基因组 DNA 经异丙醇沉淀后呈乳白色絮状沉淀,晾干后透明,溶于 TE 缓冲液中呈无色透明溶液。可见,该方法去除色素等杂质的效果良好。用其所提取的荔枝 DNA 纯度高、质量好,从而为野生荔枝叶片基因组 DNA 的 cpDNA *trnL-F* 基因扩增分析奠定了重要基础。因此,改良的 2×CTAB 法是该试验 3 种 DNA 提取方法中较适合野生荔枝基因组 DNA 的提取。在野生荔枝叶片基因组 DNA 提取过程中,影响 DNA 提取质量的主要因素有 3 个。

取材对 DNA 提取质量有关键性的影响,该试验采用的材料是野生荔枝幼嫩叶片,刚刚生长出来的荔枝幼叶呈现红色,富含 RNA 和蛋白质,而 DNA 含量少,不可用作提取材料;当幼叶红色褪去,黄中带绿,整片叶片呈现淡绿色时摘取最为合适^[17],此时的叶片不仅 DNA 含量丰富而且含有较少的多糖、多酚、色素和蛋白质等次生代谢物质,这样的材料才是最好的提取材料。它不但有利于研磨,而且所获得的 DNA 产量高质量好。

磨样和温浴时间对 DNA 提取质量的影响,若材料研磨不充分或者温浴时间不够都会影响 DNA 的产量。因此,用液氮研磨材料时应尽量把材料充分研磨成细粉直至粉末呈浅灰绿色;另外,由于野生荔枝叶片的细胞壁比较厚,所以对温浴时间的长短也有比较严格的要求。因此,为了获得较高产量的 DNA,并针对野生荔枝叶片细胞壁厚这一特点,该试验在材料研磨充分的前提下,最终把温浴时间确定为 2 h。

防止褐化对 DNA 提取质量的影响,野生荔枝作为多年生木本植物,其叶片中的多糖、多酚、色素以及蛋白质等次生代谢物质含量比较高,致使材料在 DNA 提取过程中容易发生褐变现象,从而造成所提取 DNA 的质量有所下降^[18]。因此,植物细胞中的多糖、多酚、色素以

及蛋白质等次生物质含量高无疑给植物 DNA 的提取带来了一定的困难。在植物 DNA 提取过程中,这些次生代谢物能否去除干净就直接影响着所提取 DNA 的质量。植物组织中的多糖很容易形成粘稠的胶状物质,其不但难于溶解,而且容易抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性;而多酚物质不仅容易被氧化而发生褐变现象,同样也可抑制 *Taq* DNA 聚合酶活性。如果用这些 DNA 样品作为 PCR 模板又或是酶切的底物,都是很难获得理想的结果的。因此,为了防止提取材料在 DNA 提取过程中发生褐变现象,常常会在提取缓冲液中加入一定量的抗氧化剂。抗氧化剂的种类很多,例如 PVP、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、抗坏血酸、活性炭等。

参考文献

- [1] 尤有利,王江波,施维属,等.荔枝 DNA 提取及 RAPD 扩增条件优化[J].生物技术通报,2010(4):112-115.
- [2] 姚庆荣,赵长增,王文泉.荔枝基因组 DNA 提取与 SSR 反应条件优化[J].甘肃农业大学学报,2004,39(2):131-135.
- [3] 周春阳,谢立波,李景富,等.辣椒叶片基因组 DNA 提取方法的研究[J].辣椒杂志,2011(3):35-37.
- [4] 林强,邱长玉,朱方容,等.两种桑树基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].广西蚕业,2011,48(2):1-5.
- [5] 汤文开,谭新,张辉,等.一种快速简单高效提取植物 DNA 的方法[J].华中师范大学学报(自然科学版),2007,41(3):447-449.
- [6] 王珍,方宜钧.植物 DNA 分离[J].分子植物育种,2003,1(2):281-288.
- [7] 范国强,马新业.泡桐叶片 DNA 提取[J].河南科学,2003,21(2):172-175.
- [8] Kur T C, Heien C C. RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market[J]. Bot Bull A, Acad Sin, 2000, 41(1):11.
- [9] 黄建安,黄意欢.茶树基因组 DNA 的高效提取方法[J].湖南农业大学学报,2003,29(5):402-405.
- [10] Sharp P J, Kreis M, Shewry P, et al. Location of amylase sequence in wheat and its relatives [J]. Theor Appl Genet, 1998, 75(9):289.
- [11] 陈昆松,李方,徐昌杰,等.改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J].遗传,2004,26(4):529-531.
- [12] 徐宝利,毛娟,丁永胜,等.核果类果树基因组 DNA 提取方法的研究[J].甘肃农业大学学报,2006,41(6):43-48.
- [13] 奥斯特伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1998:37-38.
- [14] 施苏华,章群,陈月琴,等.一种简易的植物核酸提取方法—从干叶和鲜叶中快速提取 RNA 和 DNA[J].中山大学学报(自然科学版),1996,35(2):103-105.
- [15] 贝鑫临,张欣,杜进,等.不同方法提取牛心朴子基因组 DNA 效果的比较研究[J].北方园艺,2011(18):135-137.
- [16] 易干军,霍合强,蔡长河,等.适于 AFLP 分析用的荔枝 DNA 提取方法[J].华南农业大学学报,1999,20(3):123-124.
- [17] 李明芳,郑学勤.荔枝基因组 DNA 的提取[J].生物技术通讯,2004,15(6):591-592.
- [18] 郭宝林,刘万水,黄文华,等.影响总 DNA 提取因素的探讨[J].中国中药杂志,2006,31(11):924-926.

光皮栎木的核型分析

王冬梅, 童再康, 卢泳全

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要:采用染色体压片方法,对光皮栎木的染色体数目及核型进行分析。结果表明:光皮栎木的染色体数目为 $2n=18$,核型公式 $2n=2x=18=4sm+14m$,臂比值变化范围在 1.02~1.81 之间,核型不对称系数(AS. K%)为 58.06%,核型属于“1B”型。

关键词:光皮栎木;染色体;核型; $2n=18$;1B

中图分类号:S 792.119 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0109-03

光皮栎木(*Swida wilsoniana* (Wanger.) Sojak)为山茱萸科栎木属落叶乔木,又名光皮树、狗骨木、斑皮抽水树等,是我国一种理想的多用途的木本油料植物。光皮栎木主要分布于长江流域及西南各地,垂直分布于海拔 1 000 m 以下。光皮栎木油可作为生物柴油的原料,其生产出的生物柴油与 0# 石化柴油燃烧性能相似,是一种安全、洁净的生物质燃油^[1]。同时光皮栎木油含有亚油酸,长期使用可以降低血脂和降低胆固醇^[2]。光皮栎木树形优美,树皮斑驳,枝叶繁茂,是一种良好的观赏绿化树种。光皮树抗逆性强,是一种理想的绿化荒山、改善生态的造林树种。同时,光皮树木材细致均匀,纹理直,易干燥,可供桥梁、枕木、建材、家具、雕刻、农具及胶合板等用。而且光皮树种子榨油后的油饼还可以作为

良好的生物肥料。因此,光皮树是一种集能源、生态、绿化、用材等优质油脂树种,开发前景广阔。

核型是指某物种所特有的一组染色体或一套染色体在有丝分裂中期的表型,其考察指标主要包括染色体的数目、大小和形态结构。核型分析是对生物细胞核内全部染色体的形态特征进行分析,是物种分类的基本依据^[3]。植物染色体的数目和核型是对染色体特征进行定性和定量描述的一种基本方法,对研究植物系统演化、物种之间的亲缘关系、起源、进化与分类、远缘杂交及遗传工程等具有重要的意义^[4]。目前对光皮栎木的栽培繁殖技术、油脂的化学成分和生物柴油制取等方面进行了大量研究,但是尚未有对光皮栎木的染色体数目与核型分析的相关报道。该试验以光皮栎木为试材,利用根尖压片技术,确定光皮栎木的染色体数目与核型,以期对细胞学和遗传学研究提供理论依据,也将对分子生物学的研究奠定理论基础。

第一作者简介:王冬梅(1987-),女,重庆潼南人,硕士,研究方向为林木遗传育种。E-mail:miyanw@163.com.

基金项目:浙江省科技厅资助项目(2008C12018)。

收稿日期:2012-07-23

Comparison on Effects of Different Methods on Extract Genomic DNA of Wild Litchi Leaves

LIU Kai-dong, YUAN Chang-chun, CHEN Yan, MO Qiu-mei, LI Hai-li

(School of Life Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract: Experiment was conducted with three different leaves of wild litchi from Guangdong and Guangxi province. The genomic DNA extraction of three methods namely SDS, CTAB and modified $2\times$ CTAB were compared. The aim was to obtain the high quality DNA extracted method from leaves of wild litchi which contained plenty of secondary substances such as polysaccharide, polyphenols, pigment and protein. The results showed that the modified $2\times$ CTAB method could extract the genomic DNA from wild litchi leaves of the highest purity and best quality. It also could apply on the PCR amplificative analysis on the cpDNA *trnL-F* gene of wild litchi leaves with distinct strips after amplification. Therefore, the modified $2\times$ CTAB method was the better method to extract the genomic DNA from wild litchi leaves.

Key words: wild litchi; genomic DNA; SDS method; CTAB method