

研究  
简报

## 甘蔗线虫病抗性基因的 PCR 检测研究

吴 杨 周 会 潘大仁\*

(福建农林大学作物学院, 福建福州 350002)

**摘 要:** 以 38 份未经线虫病常规鉴定的甘蔗种质资源为供试材料, 根据番茄抗根结线虫病基因和甜菜抗胞囊线虫病基因的保守序列区域, 分别设计了 2 条上游引物、2 条下游引物, 对设计的引物进行组合后, 应用 PCR 特异扩增从中分别筛选出各 1 对特异引物。用抗根结线虫基因设计的特异引物进行扩增最终获得了 1 条大约 460 bp 大小的特异片段; 用胞囊线虫基因设计的特异引物进行扩增最终获得了 1 条大约 690 bp 大小的特异片段, 进一步进行了 PCR-Southern 杂交, 确认了该 2 条特异引物的真实性。

**关键词:** 甘蔗; 抗线虫基因; 基因检测; PCR-Southern 杂交

中图分类号: S566

## PCR Detection of Nematode Resistant Gene in Sugarcane

WU Yang, ZHOU Hui and PAN Da-Ren\*

(Crop College, Fujian Agriculture & Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** According to the sequence of root-knot nematode resistant gene in tomato and the sequence of nematode resistant gene in sugar beet, two forward primers and two reverse primers were separately designed, and a pair of primers each was selected among them by PCR. Thirty-eight sugarcane cultivars (without conventional identification of nematode resistance) was tested by the selected PCR primers. The results showed that two special fragments of about 460 bp and 690 bp were obtained, and PCR-Southern blotting about them was made further in order to affirm the homogeneous sequences of nematode resistant gene.

**Key words:** Sugarcane; Nematode resistant gene; Gene detection; PCR-Southern blotting

线虫病是一种严重制约世界农作物产量的重要病害, 其危害超过细菌和病毒, 仅次于真菌病害, 每年约造成 1 000 亿美元的损失<sup>[1]</sup>。线虫能危害粮、油、棉、烟、茶、蔬菜、果树、林木、花卉、药材、牧草等各种植物, 它的适应范围广、传播途径多, 是一种极难防治的土传性病害<sup>[2]</sup>。植物寄生线虫有外寄生线虫和内寄生线虫两类。其中危害最严重的多属内寄生线虫, 尤以根结线虫、胞囊线虫和球形胞囊线虫 3 个属的线虫最为重要。抗线虫病种质资源的鉴定是作物抗线虫病育种的前提和基础。常规鉴定由于时间长, 且受外界环境因素的影响, 效果不显著, 应用 PCR 检测技术已被证明是一种快捷有效的方法<sup>[2-4]</sup>。国外从 20 世纪 80 年代开始抗线虫基因的定位研究。1992 年, Jung 等<sup>[5-6]</sup> 用抗线虫野生甜菜 (*Beta pataellaris*) 和栽培品种进行杂交, 利用 RFLP 对抗性基因进行了分子标记, 建立一种高密度不连续 RFLP 植物基因组图谱。1997 年 Cai 等<sup>[7]</sup> 通过特异基因组卫星标记和基因组断裂点分

析克隆出了第 1 个抗甜菜胞囊线虫基因 *Hs1<sup>pro-1</sup>*, 并通过农杆菌介导在甜菜根中进行了表达。1991 年, Aarts 等<sup>[8]</sup> 通过染色体步查法对来源于野生番茄抗根结线虫基因 *Mi* 进行了分子标记, 发现 *Mi* 基因与编码酸性磷酸酯酶的 *Aps1* 基因相连锁并定位在 6 号染色体。1998 年, 番茄抗线虫基因的研究有了重大突破, Kaloshian 等<sup>[9]</sup> 和 Milligan 等<sup>[10]</sup> 用定位克隆得到 *Mi* 基因。*Mi* 是广谱抗性基因, 既抗根结线虫又抗马铃薯蚜虫<sup>[11-12]</sup>。另外已经克隆的抗线虫基因有番茄抗根结线虫基因 *Mi-9*<sup>[13]</sup>, 番茄抗马铃薯金(白)线虫基因 *Hero*<sup>[14]</sup>, 马铃薯抗马铃薯白囊线虫基因 *Cpa-2*<sup>[15]</sup> 和小麦抗燕麦胞囊线虫基因 *Cre3*<sup>[16]</sup>。本研究根据番茄抗根结线虫基因 *Mi*<sup>[10]</sup> 的碱基序列和甜菜抗胞囊线虫基因 *Hs1<sup>pro-1</sup>*<sup>[7]</sup> 的碱基序列设计引物, 分别筛选出一对特异引物, 以 PCR 技术检测甘蔗种质资源对线虫病的抗性。

基金项目: 国家自然科学基金(30370900)和福建省自然科学基金资助项目(B0210017)。

作者简介: 吴杨(1976-), 女, 硕士, 主要从事农业生物技术研究。现福建农业职业技术学院生物系任教。

\* 通讯作者 (Corresponding author): 潘大仁。

Received(收稿日期): 2005-03-24; Accepted(接受日期): 2005-12-15.

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

38份未经过线虫病常规鉴定的甘蔗种质资源,来自福建农林大学甘蔗综合研究所(表1)。

表1 38份材料用2对特异引物 P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> 和 SP<sub>2</sub>SP<sub>3</sub> 进行 PCR 扩增的结果

Table 1 PCR result of 38 materials for primer P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> and SP<sub>2</sub>SP<sub>3</sub>

序号 Code	名称 Name	P <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	SP <sub>2</sub> SP <sub>3</sub>	序号 Code	名称 Name	P <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	SP <sub>2</sub> SP <sub>3</sub>	序号 Code	名称 Name	P <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	SP <sub>2</sub> SP <sub>3</sub>
1	松溪竹蔗	+	+	14	粤 C25	+	+	27	崖 82-96	+	+
2	滨湘竹蔗	+	+	15	粤 92/373	+	+	28	崖 90-3	+	+
3	福建大野	+	+	16	粤糖 91/854	+	+	29	桂 73-167	+	+
4	大野 F <sub>1</sub>	+	+	17	滇 93-159	+	+	30	ROC11	+	+
5	割手密	+	+	18	云 92/19	+	+	31	科 5	+	-
6	Badila	-	+	19	川 89/103	-	+	32	滇 74-141	-	-
7	福农 81-745	+	+	20	闽糖 86/2121	-	-	33	US90-1013	+	+
8	福农 91-4710	+	+	21	闽糖 93/246	-	-	34	CP00-2047	+	+
9	福农 95-1702	+	+	22	CO1001	+	+	35	LCP85-384	+	+
10	福农 91-4621	+	+	23	CP65-357	+	+	36	CP88-1762	+	+
11	福农 94-0403	+	+	24	CP72-1210	+	+	37	HOCP91-555	+	+
12	ROC16	+	+	25	CP84-1198	+	+	38	US87-1036	-	+
13	ROC10	+	+	26	崖 71-374	+	+				

注:“+”表示 PCR 扩增有特异条带,“-”表示 PCR 扩增没有特异条带。

Note: “+” indicated special band, “-” indicated no special band.

### 1.3 引物设计

根据番茄抗根结线虫病基因 *Mi*(AF148934)的碱基序列,按照引物设计的原则,结合保守序列区域,设计了4条用于扩增与该抗线虫病基因同源 DNA 片段的寡聚核苷酸引物,上游引物 P<sub>1</sub>: 5'-AGACAGTATGGACCAAAAAGAATGG-3', P<sub>2</sub>: 5'-CAACACTATGATGTGGAAAAGTGC-3'; 下游引物 P<sub>3</sub>: 5'-GAAGG-ACGAGAAGAATGAGAAGC-3', P<sub>4</sub>: 5'-AGGATCACTCACTGAAG-ACGAGC-3'。

根据甜菜抗胞囊线虫病基因 *Hs1<sup>pro-1</sup>*(BPU79733)的碱基序列,按照引物设计的原则,结合保守序列区域,设计了4条用于扩增与该抗线虫病基因同源 DNA 片段的寡聚核苷酸引物,上游引物 SP<sub>1</sub>: 5'-TGCGAATGCGAACATGACTACTACC-3', SP<sub>2</sub>: 5'-TTGAATCTGCTATGAGAAGCTGTGG-3'; 下游引物 SP<sub>3</sub>: 5'-AGACTCACTAGAACCAATCACA-3', SP<sub>4</sub>: 5'-CTTGTGC-CGTAGCTCTGCTTAAT-3'。

### 1.4 PCR 扩增和电泳

反应含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mmol/L KCl、2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μmol/L dNTP、0.2 μmol/L 上游引物、0.2 μmol/L 下游引物、50 ng 模板 DNA、1.0 U *Taq* 酶,灭菌双蒸水补足 20 μL 总体积。

PCR 扩增反应程序为 94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 40 s, 60℃ 50 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

扩增产物经含有 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 90 min(5 V/cm)后在凝胶成像系统上观察并拍照记录。

### 1.2 DNA 的提取

甘蔗基因组 DNA 的提取参照 SDS 提取法<sup>[13]</sup>; 测定 DNA 的 OD 值,并结合琼脂糖凝胶电泳来确定 DNA 的浓度与质量。将 DNA 浓度稀释到 50 ng/μL,作为 PCR 扩增的模板。

### 1.5 PCR-Southern 杂交

从用 P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> 和 SP<sub>2</sub>SP<sub>3</sub> 引物均扩增出特异条带的 36 份材料中挑选 6 份(松溪竹蔗,滨湘竹蔗,福农 81-745,CO1001,US90-1013,大田雪蔗)做杂交,杂交所用的探针都是以松溪竹蔗 DNA 为模板的 PCR 产物制作的。

PCR-Southern 杂交使用 Roche 公司的杂交试剂盒 DIC High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I。

## 2 结果与分析

2.1 甘蔗野生种松溪竹蔗号称“松溪百年蔗”,在福建省松溪县原栽种地点经百年宿根至今依然生长良好,表现出较强的抗病虫害(含线虫病)能力,所以本实验所做的引物筛选分析均以野生种松溪竹蔗为模板 DNA。根据番茄抗根结线虫病基因 *Mi* 的碱基序列设计的 2 个上游引物和 2 个下游引物组合成 4 对引物,分别为 P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>、P<sub>1</sub>P<sub>4</sub>、P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>、P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> 从中筛选出 P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> 这对特异引物,扩增片段大约为 460 bp; 根据甜菜抗胞囊线虫病基因 *Hs1<sup>pro-1</sup>* 的碱基序列设计的 2 个上游引物和 2 个下游引物组合成 4 对引物,分别为 SP<sub>1</sub>SP<sub>3</sub>、SP<sub>1</sub>SP<sub>4</sub>、SP<sub>2</sub>SP<sub>3</sub>、SP<sub>2</sub>SP<sub>4</sub> 从中筛选出 SP<sub>2</sub>SP<sub>3</sub> 这对特异引物,扩增片段大约为 690 bp。

2.2 用 P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> 这对引物对 38 份材料进行 PCR 扩增,共有 32 份材料出现特异条带,部分电泳图见图 1,具体结果见表 1。

2.3 用 SP<sub>2</sub>SP<sub>3</sub> 这对引物对 38 份材料进行 PCR 扩增,共有 34 份材料出现特异条带,见图 2 和表 1。

2.4 用于 PCR-Southern 杂交的 5 个材料结果都出现条带,表

- (in Chinese with English abstract)
- [3] Chen G-S(陈观水), Lu X-Y(陆熙园), Wu Y(吴杨), Pan D-R(潘大仁). Advances in soybean resistance breeding against cyst nematode. *Fujian Agric For Univ*(福建农业大学学报), 2003, 32(2): 156-161 (in Chinese with English abstract)
- [4] Pan D-R(潘大仁), Wu Y(吴杨), Zhou Y-F(周以飞), Dai Y-M(戴艺民), Zeng H-Y(曾惠阳), Zhang J-L(张剑亮), Lin L-Y(林龙云). Molecular detection of nematode-resistant gene in chewing canes. In: Proceeding of International Symposium on Sustainable Sugarcane & Production Technology, Nanning, China, 2004. pp 510-514 (in English with Chinese abstract)
- [5] Jung C, Koch R, Fischer F, Brandes A, Wricke G, Herrmann R G. DNA markers closely linked to nematode resistance genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using chromosome additions and translocations originating from wild beets of the *Procumbentes* species. *Mol Gen Genet*, 1992, 232:271-278
- [6] Jung C, Claussen U, Horsthemke B, Fischer F, Herrmann R G. A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes. *Plant Mol Biol*, 1992, 20:503-511
- [7] Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff H J, Sandal N N, Marcker K A, Klein Lankhorst R M, Salentijn E M, Lange W, Stiekema W J, Wyss U, Grundler F M, Jung C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 1997, 275: 832-834
- [8] Aarts J M, Hontelez J G, Fischer P, Verkerk R, van Kammen A, Zabel P. Acid phosphatase-1(1), a tightly linked molecular marker for root-knot nematode resistance in tomato: from protein to gene, using PCR and degenerate primers containing deoxyninosine. *Plant Mol Biol*, 1991, 16(4):647-661
- [9] Kaloshian I, Yaghoobi J, Liharska T, Hontelez J, Hanson D, Hogan P, Jesse T, Wijbrandi J, Simons G, Vos P, Zabel P, Williamson V M. Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus mi in tomato. *Mol Gen Genet*, 1998, 257(3):376-385
- [10] Milligan S B, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson V M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell*, 1998, 10(8):1307-1319
- [11] Rossi M, Goggin F L, Milligan S B, Kaloshian I, Ullman D E, Williamson V M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17):9750-9754
- [12] Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M, Fierens-Onstenk J, de Both M, Peleman J, Liharska T, Hontelez J, Zabeau M. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(13):1365-1369
- [13] Gu H-Y(顾红雅), Qu L-J(瞿礼嘉) trans. *Plant Molecular Biology Experiment Manual*(植物分子生物学实验手册). Beijing: Higher Education Press, 1998

## 欢迎订阅《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的全国性学术刊物。主要刊登农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与农作物有关的生物技术、生物数学、生物物理、农业气象等领域以第一手资料撰写的学术论文、研究报告、简报以及专题综述、评述等。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 1999 年起连续 3 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助,是我国连续 3 次获得资助的 15 种期刊之一。从 1997 年起连续 9 年获得中国科协“择优支持基础性和高科技学术刊物专项资助经费”的资助。从 2002 年起连续 4 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2005 年 2 月获“第三届国家期刊奖提名奖”,这是我国期刊界的最高奖项。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览(2004 年版)》登载,《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的第一名。

《作物学报》为月刊,2006 年 160 页/期,定价:30 元/册,全年 360 元。可通过全国各地邮局订阅,刊号:ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农科院作物所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

联系电话:010-68918548; 传真:010-68975562

银行汇款:交通银行北京分行农科院分理处,户名:中国作物学会,帐号:110060435018001069607

网址: <http://www.chinacrops.org/>; <http://xzbw.chinajournal.net.cn>; <http://zuowxb.periodicals.net.cn>

E-mail: [xzbw@chinajournal.net.cn](mailto:xzbw@chinajournal.net.cn); [zxwb301@mail.caas.net.cn](mailto:zxwb301@mail.caas.net.cn)