

甘薯线虫病品种抗性的 PCR 检测*

郭金平 潘大仁*

(福建农林大学农业部甘蔗遗传育种重点开放实验室, 福建福州, 350002)

摘要 根据甜菜抗线虫病基因序列, 人工合成了三条上游引物和三条下游引物, 从中筛选出一对引物, 对 11 份经抗线虫病常规鉴定的甘薯品种(包括 6 份高抗, 2 份抗病, 3 份感病)进行了 PCR 检测。结果表明: 6 份高抗品种和 1 份抗病品种出现了一条 630 bp 左右大小的特异片段, 而 3 份感病品种未出现任何条带。这与常规鉴定的结果基本吻合, 证明分子检测的可行性。

关键词 甘薯; 抗线虫病; PCR 检测

中图分类号: S531 文献标识码: A

PCR Detection of Nematode Resistance in Sweet Potato

GUO Jin-Ping PAN Da-Ren

(The Key Laboratory of Sugarcane Genetics and Breeding, the Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian, 350002, China)

Abstract According to the sequence of nematode resistant gene in sugar beet, three forward primers and three reverse primers were produced by synthetic. A pair of primers were selected among them. 11 sweet potato cultivars (including 6 nematode high resistant, 2 resistant and 3 sensitive cultivars by conventional identification) were detected by PCR. The results showed that a special fragment of about 630 bp appeared in 6 high resistant and 1 resistant cultivars, and nothing in 3 infected cultivars. The result was in correspondence with that of conventional identification, and suggested the feasibility of PCR detection.

Key words Sweet potato; Nematode resistance; PCR detection

线虫病(Nematode)是我国农作物上主要病害之一, 胞囊线虫危害包括糖料作物甘蔗、甜菜、十字花科作物、果树、甘薯、马铃薯、豆科作物、蔬菜等八大类几十种作物, 据统计, 全世界每年因植物线虫危害而造成的经济损失超过 1000 亿美元^[1]。鉴定各种作物的抗线虫病种质资源可为作物抗线虫病育种提供前提和基础。常规鉴定时间长, 有时受到种种条件的限制, 效果并不显著。本文根据抗线虫病基因序列 HSI^{pro-1}^[2]设计引物, 筛选出一对特异引物, 通过 PCR 扩增, 能快速准确地检测甘薯种质资源对线虫病的抗性情况。

1 材料和方法

1.1 植物材料

共 22 份甘薯品种, 其中 11 份是经过常规鉴定

的, 另外 11 份未经过常规鉴定(见表 1), 来自福建农业大学甘薯教研室资源圃。

1.2 DNA 提取

甘薯基因组 DNA 从 10~ 20 mm 长的幼叶中提取, 采用 CTAB 法^[3]。每 5 g 叶片加入 1 g PVP, 在液氮中研磨成粉末, 再加入 15 mL 含 0.4% β 巯基乙醇的 2% CTAB 提取液(0.2 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1.4% mol/L NaCl, 2% CTAB), 匀浆, 在 65 °C 水浴中保温 1 h, 然后冷却至室温加入等体积的氯仿与异戊醇混合物(24:1), 混匀溶液。混合液在 3400 r/min 离心 15 min, 上清液转移至 50 mL 的离心管中, 加入 2~ 3 倍体积的 20% 乙醇。轻轻往复倒转试管, 直至 DNA 沉淀, 把 DNA 挑出, 用 76% 乙醇(含 0.2 mol/L 醋酸钠)溶液洗 20 min, 然后用 76% 乙醇(含 0.01 mol/L 醋酸

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870545); 福建省国际科技资助项目(20001004)

作者简介: 郭金平(1972-), 男, 江西吉安人, 助教, 硕士生, 研究方向, 分子生物学和生物工程。

* 通讯作者。

Received on(收稿日期): 2000-10-08, Accepted on(接受日期): 2001-03-17

表1 供试甘薯材料

Table 1		The tested sweet potato materials			
样品号 Sample number	品种名 Cultivar	线虫病抗性* Resistance to nematode	样品号 Sample number	品种名 Cultivar	线虫病抗性 Resistance to nematode
1	金山 908	高抗	1	美国红	待测定
2	金山 25	高抗	2	澳洲黄	待测定
3	AB94078-1	高抗	3	黄金千贯	待测定
4	AB94001-8	高抗	4	日清 1 号	待测定
5	P616-23	高抗	5	南瑞苕	待测定
6	福建 97-1909	高抗	6	胜利百号	待测定
7	福建 96-1193	抗病	7	南薯 88	待测定
8	福建 1885	抗病	8	湘薯	待测定
9	苏渝 76	高感	9	新种花	待测定
10	苏薯 2 号	感病	10	夏引 1 号	待测定
11	栗子香	高感	11	金山 57	待测定

注: *: 经常规鉴定, 线虫病抗性常规鉴定的结果由徐州甘薯中心提供。

Note: *: The resistance of nematode has been identified, the results of nematode resistance were produced by sweet potato center in xuzhou

铵)溶液清洗 10 s, 再用 70% 乙醇清洗 30 min, 最后凉干, DNA 溶解在 300 μL 的 TE (0.01 mol/L, Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA) 缓冲液中。置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。测定提取 DNA 的 OD_{280 nm} 和 OD_{260 nm} 值, 并结合琼脂糖凝胶电泳来判断 DNA 的含量与质量。最后将样品的 DNA 浓度稀释成 50 ng/ μL , 作为 PCR 扩增的样品。

1.3 引物设计^[4]

根据线虫病基因 Hs1^{pm-1} 序列, 设计了 6 条用于扩增抗线虫病基因类似序列的寡聚核苷酸引物^[5,6], 引物由上海生工 (Sangon) 生物工程公司合成, 序列如下: 上游引物: P₁: 5'-GGGCGCGTTGGA TT-3', P₂: 5'-TCCTTCCGA GGTTA GCCACGT-3', P₃: 5'-TAGTTTGGCCTTGGTGA GC-3'; 下游引物: P₄: 5'-CTCCA TAACTCCCTA TCGC-3', P₅: 5'-CAGTTGCGTCTTCA GA TGCA-3', P₆: 5'-CAACTGA GCCA CAAA TCCG-3'。

1.4 PCR 扩增和电泳

dNTP, *Taq* 酶均为上海生工 (Sangon) 生物工程公司产品。反应体积为 20 μL , 其中包含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物浓度, DNA 模板 50 ng, *Taq* 酶 1.5 U。

将样品放入 PE-9600 型 DNA 扩增仪中进行 PCR 扩增。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物经含有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭的 1.5%

琼脂糖凝胶电泳 90 min (5 V/cm) 后在 Vilber Loum at VDS 凝胶成像系统上观察并照相记录。

2 结果与分析

2.1 通过对 PCR 技术各种影响因素的研究, 结果发现: 在 20 μL 的反应体系中, 2.0 mmol/L MgCl₂, 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物浓度, 50 ng 植物基因组 DNA, 1.5 U 的 *Taq* 酶, 比较适合甘薯总 DNA 的特异扩增。

2.2 按照以上 PCR 扩增的条件, 以高抗品种金山 25 为模板 DNA, 根据排列组合的原理, 对由上海生工合成的三条上游引物和三条下游引物进行排列组合, 共产生 9 对引物组合, 分别为 P₁P₄、P₁P₅、P₁P₆、P₂P₄、P₂P₅、P₂P₆、P₃P₄、P₃P₅、P₃P₆, 从中筛选出 P₁P₄ 这对特异引物。

2.3 用 P₁P₄ 这对特异引物对 8 个抗病品种 (其中包括 6 个高抗品种和 2 个抗病品种) 和 3 个感病品种 (包括 2 个高感品种和 1 个感病品种) 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增后, 6 个高抗品种均产生一条 630 bp 左右的 DNA 特异片段, 在另外两个抗病品种中, 福建 96-1193 出现了该特异片段, 福建 1885 则无任何条带; 而三个感病品种未出现任何条带 (见图 1)。

2.4 用 P₁P₄ 这对特异引物对另外 11 个未知抗性的甘薯品种 (编号为 1~11) 进行抗线虫病 PCR 检测, 结果发现有 8 个品种 (分别为澳洲黄、日清 1 号、南瑞苕、南薯 88、湘薯、新种花、夏引 1 号、金山 57) 出现了 630 bp 的特异 DNA 片段, 另外 3 个品种 (美国红、黄金千贯、胜利百号) 则无任何条带 (见

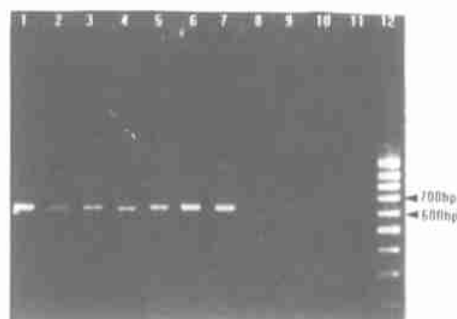


图 1 11 个甘薯品种总 DNA 的 PCR 扩增产物 (已通过常规鉴定)
Fig 1 PCR products of eleven sweet potato total DNA (with conventional identification)
1~11 分别为 11 份甘薯品种 1~11 的 PCR 产物, 12 为 100 bp DNA ladder
Lane 1~11: PCR products of sweet potato cultivar No. 1~11, respectively, Lane 12: 100 bp DNA ladder

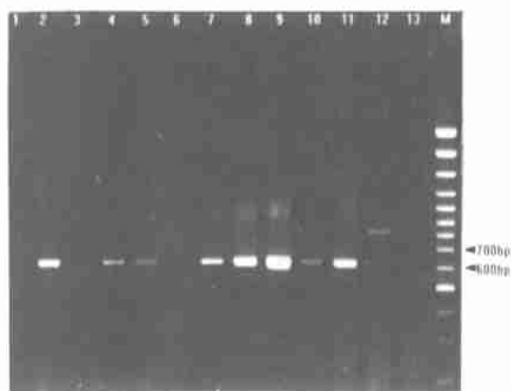


图2 11个甘薯主栽品种总DNA PCR 扩增产物(未常规鉴定)

Fig 2 PCR products of eleven principal cultivars total DNA (without conventional identification)

1~ 11 分别是 11 份待检甘薯品种 1~ 11 的 PCR 产物, 12 是阳性对照, 13 是阴性对照, M: 100 bp DNA ladder

Lane 1~ 11: PCR products of sweet potato cultivar No. 1~ 11, respectively, Lane 12: positive control, Lane 13: negative control, M: 100 bp DNA ladder

图2)。表明澳洲黄等 8 个品种可能是高抗或抗线虫病的, 而美国红等 3 个品种很可能是感病的品种。

3 讨论

3.1 PCR 技术对甘薯品种抗线虫病基因检测的可行性

根据多数抗病基因(R)编码蛋白质的核苷酸结合区(Nucleus Binding Site NBS)和富含亮氨酸重复(Leucine Rice Repeat, LRR)保守区特点^[7], 我们按照甜菜抗线虫病基因设计了 6 条 PCR 特异引物: P₁、P₂、P₃、P₄、P₅、P₆, 将它们组合成 9 对引物。利用甘薯高抗品种金山 25 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 引物对 P₁P₄ 可获得一条约为 630 bp 大小的 PCR 扩增产物, 然后对已经过常规鉴定的甘薯品种进行特异扩增, PCR 检测结果与常规检测相当吻合, 吻合度高达 7/8。产生误差的原因可能来自两个方面, 一是在常规鉴定中, 由于环境条件变化或统计误差等, 使感病品种被误认为是抗病品种。另一方面可能是在提取 DNA 时样品纯化不足, 仍含较多的色素或糖类等抑制性物质, 从而抑制了 DNA 的扩增, 影响检测效果。

3.2 PCR 引物的特异性

由于甘薯与甜菜属于不同的科, 亲缘关系较远, 其抗病基因同源序列^[8]的保守区域相对少, 所

以在甘薯品种中只筛选出一对特异引物, 并获得一条 630 bp 左右的 DNA 特异片段^[9]。此条带能很好的把抗病品种与感病品种区分开来, 因此利用该对引物能有效地检测甘薯品种对线虫病的抗性状况。此片段很可能是一个抗线虫病基因同源序列, 对其同源性大小, 尚需进一步研究。

3.3 评价 11 份未常规鉴定的甘薯主栽品种对线虫病的抗性

本实验对 11 份未经常规鉴定的甘薯主栽品种的基因组 DNA 进行了特异扩增, 结果表明: 其中有 8 个品种出现了 630 bp 左右的片段, 另外 3 个品种则未出现任何条带。此结果与常规育种目标的现实情况相符合。但其最终结果有待于进一步的田间接种鉴定。

References

- [1] Xie H (谢辉), Feng Z-H (冯志新). The status of classification for plant nematodes *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2000, 30(1): 1~ 7
- [2] Cai D, Kleine M, Kifle S, *et al*. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet *Science*, 1997, 275: 832~ 834
- [3] Written by Paul G Thompson *et al*. Translated by Ji Z-X (季志仙). Genetic linkage of RAPD markers in sweet potato *Foreign Agricultural Science-Rain Fed Crops* (国外农学—杂粮作物), 1999, 19(1): 10~ 13
- [4] Kong J (孔杰), Liu P (刘萍), Zhang Y (张岩). The application of PCR technique in shrimp disease pathogen examination. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 1994, 14(6): 43~ 46
- [5] Feng J (冯洁), Chen W-Q (陈万权), Kang X-H (康晓惠). The application of biotechnology in diagnosis of plant disease *Biotechnology* (生物技术), 1999, 9(1): 33~ 37
- [6] Liu M-J (刘明军), Huang J-C (黄俊成), Wu J (武坚). PCR assay for detection of HSV and CMV in once PCR reaction tube *Biotechnology* (生物技术), 1999, 9(3): 45~ 47
- [7] Qin G-J (秦根基), Li W-L (李万隆), Chen P-D (陈佩度). Update of resistance genes and resistance gene analogs in plants *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), 1999, 22(3): 102~ 107
- [8] Luo Z-C (骆志成). PCR detection of patient infected by *aspergillus* (Review). *Foreign Medical Science-Biochemistry and Biotechnology* (国外医学、生物化学与检验学分册), 1998, 19(6): 278~ 281
- [9] Lopes S A and Damann K E. PCR detection of *X. albilineans* from vascular sap of cane *Sugar Cane*, 1997, 5: 13~ 18