

思彬彬,张学娟,张靠稳.不同寄主上南方根结线虫的 ISSR-PCR 鉴别[J].江苏农业科学,2014,42(3):35-36.

# 不同寄主上南方根结线虫的 ISSR-PCR 鉴别

思彬彬,张学娟,张靠稳

(北方民族大学生物科学与工程学院,宁夏银川 750021)

**摘要:**以南方根结线虫雌虫 DNA 为基础,通过 ISSR-PCR 分子标记鉴别出寄生在黄瓜和番茄上的南方根结线虫。本试验中 ISSR-PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ ,各因素的最佳浓度分别为:dNTPs 0.24 mmol/L、 $\text{Mg}^{2+}$  2.1 mmol/L、*Taq* 酶 10.4 U、引物 0.3  $\mu\text{mol/L}$ 、DNA 140 ng。通过对 50 个 ISSR 引物的筛选,得到 1 个引物 841,该引物能将寄生在不同寄主上的南方根结线虫加以鉴别。

**关键词:**南方根结线虫;雌虫;ISSR-PCR;鉴别;引物

**中图分类号:**S432.4<sup>+</sup>5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0035-01

南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 是一种分布广、危害严重的植物寄生线虫<sup>[1]</sup>,通过其在侵染的寄主植物上的寄生行为直接引起作物的产量损失。传统方法主要根据根结线虫形态学进行鉴定和分类,但由于其较大的变异性导致有时结果不够准确<sup>[2]</sup>。本试验将南方根结线虫形态学和 ISSR-PCR 分子标记的方法相结合,研究了贺兰山军马场不同寄主上南方根结线虫中种群的种类,为今后宁夏地区南方根结线虫病害的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 南方根结线虫样本的采集

2012 年 1 月在贺兰山军马场温棚采集有大量根结的黄瓜根部组织;2012 年 7 月分别在贺兰山军马场露天采集有大量根结的番茄根部组织。

### 1.2 南方根结线虫的形态学鉴定

依据参考文献[2],分别观察黄瓜和番茄根结中的根结线虫雌虫会阴花纹。

### 1.3 2 种寄主根部南方根结线虫 DNA 的提取

提取方法根据参考文献[3]

### 1.4 2 种不同寄主上南方根结线虫的 ISSR-PCR 扩增

利用单因素试验与正交设计试验相结合的方法,建立并

优化了根结线虫 ISSR-PCR 的体系。适用于南方根结线虫的 25  $\mu\text{L}$  ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度分别为:dNTPs 0.24 mmol/L、 $\text{Mg}^{2+}$  2.1 mmol/L、*Taq* 酶 10.4 U、引物 0.3  $\mu\text{mol/L}$ 、DNA 140 ng。

### 1.5 黄瓜与番茄根部南方根结线虫的 ISSR-PCR 鉴别

将取自黄瓜和番茄根部的南方根结线虫采用 ISSR-PCR 分子标记,利用 50 个引物进行筛选。

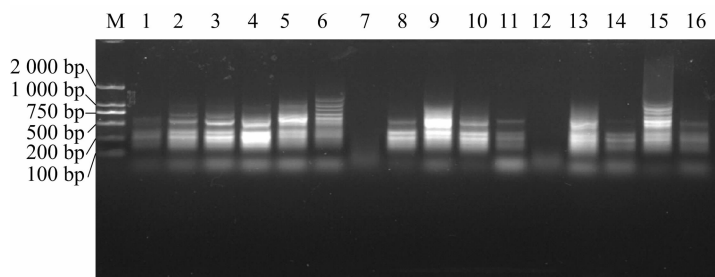
## 2 结果与分析

### 2.1 形态学鉴定结果

依据参考文献[2]的方法,鉴别出所采黄瓜和番茄的根部样本中的根结线虫均为南方根结线虫。同时前人的研究结果也显示该地区的根结线虫为南方根结线虫。

### 2.2 ISSR-PCR 扩增结果分析

由图 1 可知,以不同寄主上的南方根结线虫 DNA 为模板,利用 ISSR-PCR 分子标记的方法,使用不同的引物对其进行扩增反应,结果显示,虽然形态学上雌虫的会阴花纹观察发现寄生在黄瓜和番茄根部的根结线虫均为南方根结线虫,但是利用 ISSR-PCR 分子标记发现,南方根结线虫在不同寄主上却存在差异性。本试验中筛选了 50 个引物,发现 1 个引物对不同寄主上的南方根结线虫扩增后存在差异性。



M—DL2000; 1~16—ISSR-PCR 扩增结果 (奇数寄主为黄瓜, 偶数寄主为番茄)

图1 不同寄主上的南方根结线虫DNA的ISSR-PCR扩增结果

### 2.3 鉴别结果

在筛选的 50 个 ISSR 引物中,其中有 1 个引物 841 扩增的结果显示两者之间存在差异性(图 2)。来自不同寄主的南方根结线虫,其会阴花纹均具背弓较高的特点,但其 DNA 水平上却存在差异。A泳道均为黄瓜根部的南方根结线虫,B

收稿日期:2013-10-25

作者简介:思彬彬(1977—),女,宁夏银川人,硕士,讲师,主要从事分子植物病理学研究。Tel:(0951)2067893;E-mail:sibinbin115@163.com。

邹芝英,肖 炜,李大宇,等. 吉富罗非鱼核 DNA 含量的测定[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):36-38.

# 吉富罗非鱼核 DNA 含量的测定

邹芝英,肖 炜,李大宇,徐 跑,祝璟琳,韩 珏,乐贻荣,杨 弘

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,江苏无锡 214081)

**摘要:**以吉富罗非鱼的外周血细胞为样本、小鼠淋巴细胞 DNA 为标准(7.0 pg/2C),采用流式细胞术结合内标法测定血细胞的核 DNA 含量。结果显示:吉富罗非鱼的核 DNA 含量为小鼠淋巴细胞的  $0.339\ 2 \pm 0.009\ 0$  倍,绝对含量为  $(2.374\ 5 \pm 0.063\ 0)$  pg/2C。

**关键词:**吉富罗非鱼;流式细胞术;DNA 含量

**中图分类号:** S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0036-03

罗非鱼(*Tilapia*),俗称非洲鲫鱼,以其生长快、食性杂和适应性强等优势成为国际上养殖最广泛的品种之一,是国际贸易第三大水产品。中国的罗非鱼产量占全球总产量的一半,其出口量高居世界第一位<sup>[1]</sup>。吉富品系尼罗罗非鱼(genetically improved farmed *Tilapia Oreochromis niloticus*, GIFT,简称吉富罗非鱼)是中国主要养殖的罗非鱼品种(系)之一,也是中国养殖的罗非鱼品种中生长最快的品种(系)之一。吉富罗非鱼是由国际水生生物资源管理中心、挪威水产

养殖研究所和菲律宾的一些国家级研究机构通过对 4 个非洲原产地(埃及、加纳、肯尼亚、塞内加尔)直接引进的尼罗罗非鱼品系和 4 个在亚洲地区(以色列、新加坡、泰国、中国台湾)广泛养殖的尼罗罗非鱼品系进行混合选育进而获得的优良品系<sup>[2]</sup>。经过近 20 年的种内群体间杂交和选育,该品系已经显示出优越的生长优势和潜能<sup>[3-4]</sup>,引起了亚太地区的广泛兴趣和关注,多个国家进行了引种并启动了对其进一步改良和推广的国家育种计划<sup>[5]</sup>。为了促进中国罗非鱼养殖持续稳定的发展,2006 年 8 月世界渔业中心向中国水产科学研究院淡水渔业研究中心输送了 60 个家系的吉富罗非鱼,以期在中国进行吉富罗非鱼的选育和推广工作,这是中国第一次引进如此多家系的吉富罗非鱼。目前研究人员已经对该群体进行了连续 3 代的家系选育,同时开展了对不同家系的生长性能<sup>[6-7]</sup>、遗传多样性<sup>[8-9]</sup>等方面的评估工作。

脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物体内的遗传物质,一个细胞核中所含的 DNA 总量对于某物种是一定的。生物 DNA 含量的研究不但是研究物种间差别的重要方法,而且对

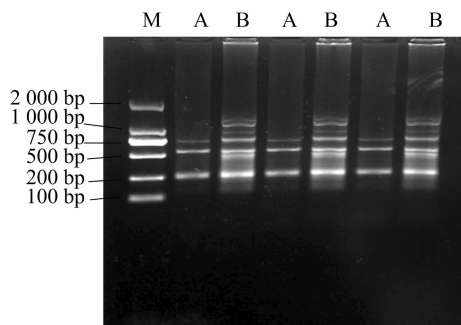
收稿日期:2013-08-23

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-49);

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号:2011JBFA04);现代农业人才支撑计划;罗非鱼物种资源保护项目;作者简介:邹芝英(1980—),女,江苏无锡人,硕士,助理研究员,主要从事水产动物遗传育种与分子生物学研究。Tel:(0510)85559009;E-mail:zouzy@ffrc.cn。

通信作者:杨 弘,研究员,主要从事鱼类育种研究。Tel:(0510)85550252;E-mail:yangh@ffrc.cn。

泳道均为番茄根部的南方根结线虫,而引物 841 能将二者鉴别开来。



M—DL2000; A寄主为黄瓜; B寄主为番茄

图2 引物841对不同寄主上南方根结线虫的鉴别结果

## 3 讨论

一直以来,会阴花纹在鉴定根结线虫的种的效果方面是值得肯定的;但是,很多研究显示,会阴花纹存在较大的变异性,而 ISSR-PCR 能够帮助弥补会阴花纹变异所带来的鉴定

局限性。与此同时,南方根结线虫具有 4 个生理小种,也有可能不同的寄主上寄生的是不同的生理小种。而本次试验采集黄瓜和番茄根部样品的季节不同,黄瓜是在冬季蔬菜温棚中采集的根部样本,而番茄却是在 7 月份的露天大田里采集的根部样本,所以,笔者推断 ISSR-PCR 结果之所以有差异性,可能是不同的生理小种造成的。以往对南方根结线虫生理小种的鉴别依据是鉴别寄主,本试验结果提示以后可以考虑利用 ISSR-PCR 鉴别南方根结线虫的生理小种;并且本试验结果也可作为今后宁夏地区根结线虫病害的防治提供一定的理论依据。

## 参考文献:

- [1] 黄 利,王 宇,董林林,等. 南方根结线虫与秀丽线虫同源基因的鉴定及其应用分析[J]. 中国农业大学学报,2010,15(4): 45-50.
- [2] 廖金铃,蒋 寒,孙龙华,等. 中国南方地区作物根结线虫种和小种的鉴定[J]. 华中农业大学学报,2003,22(6):544-548.
- [3] 思彬彬,张靠稳,孟北乾. 雌根结线虫 DNA 的提取方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):27-28.