



曾帅,廖澳琳,陈晨,等. 番茄抗马铃薯孢囊线虫 *HeroA* 基因的分子检测[J]. 南京农业大学学报,2026,49(3):551-558.

Zeng S,Liao A L,Chen C,et al. Molecular detection of the tomato *HeroA* gene conferring resistance to potato cyst nematodes[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(3):551-558.

番茄抗马铃薯孢囊线虫 *HeroA* 基因的分子检测

曾帅¹,廖澳琳¹,陈晨¹,江雨玟¹,胡文军¹,焦科铭¹,汤云川²,王暄^{1*}

(1.南京农业大学植物保护学院/农林生物安全全国重点实验室,江苏 南京 211800;

2.成都市农林科学院,四川 成都 611130)

摘要:[目的]*HeroA* 是一个对马铃薯孢囊线虫多个致病型具有广谱抗性的抗病基因,为了快速准确地鉴定不同番茄品种中是否携带该基因,从而为番茄抗性品种的合理布局及遗传育种提供指导,本文建立了一种基于 SCAR-PCR 的特异性分子检测技术。[方法]以马铃薯孢囊线虫抗性品系‘LA1792’和感病品种‘MoneyMaker’的 DNA 样本为模板,扩增 *HeroA* 及其同源基因序列,设计并筛选特异性靶向 *HeroA* 的引物组合,优化 PCR 反应条件并测定其检测灵敏度。在此基础上进一步以 30 个不同番茄品种为检测对象,利用新建立的 SCAR-PCR 技术对 *HeroA* 进行检测,同时与已报道的方法进行比较。[结果]筛选获得的 HERO-F9/HERO-R11 引物组合,在 62 °C 退火温度下,能够在马铃薯孢囊线虫抗性品系‘LA1792’样本中特异性扩增出约 700 bp 的条带,而在感病品种‘MoneyMaker’中无扩增条带,且检测灵敏度达到 0.1 ng·μL⁻¹ DNA 模板;对 30 个不同番茄品种的测试表明,SCAR-PCR 检测结果与已报道的方法检测结果完全一致,其中‘红果’‘大红’‘黑金刚’等 11 个品种含有马铃薯孢囊线虫抗性基因 *HeroA*,而其他 19 个品种均不含有该基因。[结论]本研究为马铃薯孢囊线虫抗性基因 *HeroA* 的分子检测提供更加准确的方法。

关键词:马铃薯孢囊线虫;番茄;抗性基因;*HeroA* 基因;分子检测

中图分类号:S432.1

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2026)03-0551-08

Molecular detection of the tomato *HeroA* gene conferring resistance to potato cyst nematodes

ZENG Shuai¹,LIAO Aolin¹,CHEN Chen¹,JIANG Yuwen¹,HU Wenjun¹,
JIAO Keming¹,TANG Yunchuan²,WANG Xuan^{1*}

(1.College of Plant Protection/State Key Laboratory of Agricultural and Forestry Biosecurity,Nanjing Agriculture University,
Nanjing 211800,China;2.Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Sciences,Chengdu 611130,China)

Abstract:[Objectives]*HeroA* is a broad-spectrum resistance gene against potato cyst nematodes. To rapidly and accurately identify tomato varieties that carry the *HeroA* gene, and to provide guidance for the rational deployment of varieties and genetic breeding programs, this study developed a specific molecular detection technique based on sequence characterized amplified region-polymerase chain reaction (SCAR-PCR). [Methods] Genomic DNA samples from the potato cyst nematode-resistant line ‘LA1792’ and susceptible variety ‘MoneyMaker’ were used as templates to amplify and align the sequences of the *HeroA* gene and its homologs. Primer pairs specific to *HeroA* gene were then screened. The PCR reaction conditions were optimized and the detection sensitivity was also evaluated. The developed SCAR-PCR technique was subsequently applied to detect the *HeroA* gene in 30 different tomato varieties. The results were compared with those obtained from previously reported methods to assess the performance of this technique. [Results] The HERO-F9/HERO-R11 primer combination specifically amplified a 700-bp band from the DNA samples of LA1792 at an annealing temperature of 62 °C, whereas no amplification was observed in the susceptible variety MoneyMaker. The detection sensitivity of this assay reached up to 0.1 ng·μL⁻¹ of template DNA. Testing across 30 different tomato varieties demonstrated that the detection results of SCAR-PCR developed in this study were entirely consistent with those using previously reported methods. The results revealed that 11 varieties, including ‘Hongguo’, ‘Dahong’ and ‘Heijingang’, carry the potato cyst nematode resistance gene *HeroA*, while the remaining 19 varieties lacked this gene. [Conclusions] The present study provides a more accurate method for the molecular detection of the potato cyst nematode resistance gene *HeroA* in tomato plants.

Keywords: potato cyst nematodes; tomato; resistance gene; *HeroA*; molecular detection

收稿日期:2025-01-24

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1100200);国家自然科学基金项目(32272497)

*通信作者:王暄,教授,博士,研究方向为植物线虫学,E-mail:xuanwang@njau.edu.cn。

马铃薯孢囊线虫包括马铃薯金线虫 (*Globodera rostochiensis*) 和马铃薯白线虫 (*G. pallida*), 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是其最适寄主, 同时也会侵染番茄 (*S. lycopersicum*) 和茄子 (*S. melongena*) 以及其他多种茄科植物^[1]。马铃薯孢囊线虫病一般会造成马铃薯减产 20%, 危害严重时可导致产量损失高达 80%~90%, 甚至绝收^[2-3]。由于马铃薯孢囊线虫对马铃薯产业威胁巨大, 已被全球 100 多个国家列为检疫性有害生物, 我国也于 2020 年将其列入农业农村部《全国农业植物检疫性有害生物名录》^[4]。马铃薯金线虫在南美洲、北美洲、欧洲、非洲、亚洲和大洋洲的 72 个国家均有发生和分布, 而马铃薯白线虫则在全球 50 多个国家有害报道^[5]。我国于 2018 年首次在贵州省赫章县和威宁县发现马铃薯金线虫^[6], 此后, 在云南省昭通市鲁甸县和曲靖市会泽县等地也有该线虫为害的报道^[7-10], 对我国的马铃薯产业造成了极大的威胁。

通常采用化学杀线剂与非寄主植物轮作或施用生防菌剂对马铃薯孢囊线虫病进行防治^[11]。此外, 种植抗病品种被认为是最经济有效的防治措施之一。位于马铃薯 5 号染色体上的显性抗性基因 *H1*, 对马铃薯金线虫 Ro1 和 Ro4 致病型具有持久的抗性, 在全球的马铃薯品种中被广泛应用^[12]。除此之外, 目前共有 3 个马铃薯孢囊线虫抗性基因被成功克隆, 分别是 *Gpa2*、*Gro1-4* 和 *HeroA*^[13], 其中 *HeroA* 基因来自野生醋栗番茄 (*S. pimpinellifolium*) ‘LA121’, 并首先被引入到番茄栽培品系 ‘LA1792’ 中^[14], 该基因几乎对所有马铃薯金线虫以及部分马铃薯白线虫致病型具有抗性, 因此已被成功地应用到多个商业化生产的番茄品种中^[15-16]。

测试番茄品种是否具有 *HeroA* 介导的抗性, 可以通过人工接种马铃薯孢囊线虫进行测定, 然而该方法操作相对繁琐且周期较长, 同时对于马铃薯孢囊线虫这类检疫性有害生物来说, 人工接种存在较大的扩散风险。利用分子生物学技术检测番茄基因组中是否含有 *HeroA* 基因, 能够极大地提高抗性品种的筛选效率, 尤其是对于遗传育种过程中抗性材料的靶向性筛选极其重要。Cabrera 等^[17]开发了引物组合 HERO-F2/HERO-R3, 用该引物扩增马铃薯孢囊线虫抗性品系 ‘LA1792’, 并检测到 2 个大小相近的 DNA 片段, 而在感病品种 ‘Moneymaker’ 中仅扩增出 1 个片段。由于在抗性品种中扩增的 2 条带较为接近, 极易与感病品种的带型混淆, Uehara 等^[18]开发了基于限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的检测技术, 能够清晰地将抗感品种区分开, 但是操作相对繁琐, 不利于推广应用。因此, 开发一种高效特异的 *HeroA* 基因分子检测技术, 对于马铃薯孢囊线虫抗性品种的合理布局以及植物遗传育种均具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

马铃薯孢囊线虫抗性品系 ‘LA1792’ 和感病品种 ‘Moneymaker’ 样本来自詹姆斯·赫顿研究所 (James Hutton Institute, JHI), SPARTA 来自比利时根特大学 (Ghent University), ‘合作 903’ 来自江苏省农业科学院, 其他品种为市场购得。

1.2 番茄 DNA 提取

番茄 DNA 的提取采用 NaOH 法^[19], 取新鲜健康番茄的叶片约 0.05 g, 或者根、茎、叶柄等其他组织 0.15 g, 放入液氮中速冻后用研钵快速研磨 1~2 min, 使其呈粉末状。将粉末转移至 2 mL 离心管中, 加入 500 μ L 浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液后颠倒混匀, 静置 10 min, 室温下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取 10 μ L 上清液转移至新的离心管中, 加入 90 μ L TE buffer (100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA) 混匀, 利用 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) 测定浓度后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 番茄样本中 *HeroA* 基因的分子检测

用不同引物组合 (表 1) 分别扩增番茄 DNA 样品。PCR 反应体系: 2 $\times$ Ex Taq Mix 25 μ L, 5 μ mol·L⁻¹ 引物各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 加水补足至 50 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56~62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 同时扩增番茄 β -tubulin 基因作为内参, 扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。其中, HERO-F4/HERO-R6 的扩增产物经 Gel Extraction Kit (Omega, USA) 切胶回收, 用 Taq I 限制性内切酶进行酶切。酶切反应体系: 纯化后产物 10 μ L, Taq I 酶 (2 000 U) 1 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, 10 g·L⁻¹ BSA 2 μ L。将以上所有扩增产物或酶切产物于 20 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳 30 min (电压 100 V), 用 EB 染色后在凝胶成像系统拍照保存。HERO-F2/HERO-R3 的扩增产物经切胶回收, 采用 T₄ DNA Ligase (TaKaRa, 日本) 连接至

pMD19-T vector(TaKaRa, 日本)载体,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 本研究所有的引物

Table 1 List of Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequences(5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature	文献 References
HERO-F2	TTCCACCATTGTTTACTGCCAAG	58	[17]
HERO-R3	GAATGCAGAAGGGATCTCCGTAAG		
HERO-F4	TTGTGGATGGCTGAAGGG	62	[18]
HERO-R6	CAGCTTTGACAGTTTGAATAATC		
HERO-F7	TGGAAGTGAAGAGGAAGAGGAAG	56~62	本研究 This study
HERO-R10	AGGTGTGATGGGAAAAGAATG		
HERO-F9	GACACGGACAATATCCAAAGCAG		
HERO-R11	TCTTATTCATACAAACCTGATAG		
Tub-F1	AACCTCCATTTCAGGAGATGTTT	58	[20]
Tub-R1	TCTGCTGTAGCATCCTGCTATT		

1.4 序列的分析比对

登录 NCBI 的 GenBank 数据库进行序列的 BLASTn 比对^[21],利用集成软件 BioXM 进行多序列的排列比对^[22]。

2 结果与分析

2.1 马铃薯孢囊线虫抗、感品种 *HeroA* 基因及其同源序列比对分析

分别以马铃薯孢囊线虫抗性品系 ‘LA1792’ 和感病品种 ‘Moneymaker’ 的 DNA 为模板,利用引物 HERO-F2/HERO-R3 进行 PCR 检测,扩增结果如图 1 所示。抗性品系 ‘LA1792’ 样本在约 700 bp 的位置产生 2 条大小相近的条带,而感病品种 ‘Moneymaker’ 中在相同位置仅能扩增出 1 条特异性条带。分别将抗、感品种样品中的扩增产物进行回收、克隆测序,序列比对结果(图 2)显示: ‘LA1792’ 样本中相对分子质量较大的条带序列与已报道的 *HeroA* 基因(AJ457051)序列相似度为 100%,而 ‘LA1792’ 的低相对分子质量条带以及 ‘Moneymaker’ 的特异性条带序列均与 *HeroA* 的同源基因 *Helper3*(AJ457050)序列完全一致。

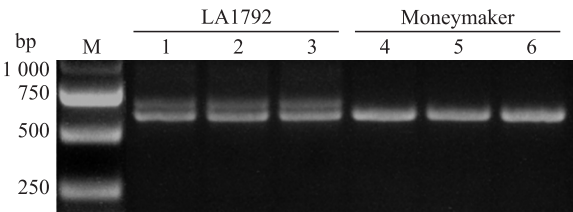


图 1 马铃薯孢囊线虫抗、感番茄样本用 HERO-F2/HERO-R3 引物组合检测结果

Fig. 1 Comparison of amplified DNA fragments in potato cyst nematode-resistant and susceptible tomato samples using HERO-F2/HERO-R3 primers

M. DL2000 maker; 1 ~ 3. 抗性品系 ‘LA1792’ Resistant line ‘LA1792’; 4 ~ 6. 感病品种 ‘Moneymaker’ Susceptible variety ‘Moneymaker’.

2.2 *HeroA* 特异性 SCAR-PCR 检测体系的建立

以 *HeroA* 与 *Helper3* 差异序列为模板,分别设计正向引物 HERO-F7 和 HERO-F9,反向引物 HERO-R10 和 HEROR-11(图 2,表 1),用上述不同引物组合分别对 ‘LA1792’ 和 ‘Moneymaker’ 样本进行 PCR 检测。结果如图 3 所示;HERO-F7/HERO-R10、HERO-F7/HERO-R11 引物组合在 ‘LA1792’ 和 ‘Moneymaker’ 中均会产生 1 条约 300 bp 的条带,无法有效区分抗、感品种;HERO-F9/HERO-R10 引物组合在 LA1792’ 和 ‘Moneymaker’ 中同时扩增出 2 条相对分子质量接近条带;而 HERO-F9/HERO-R11 引物组合仅在抗性品系 ‘LA1792’ 中扩增出约 700 bp 的明亮条带,而在感病品种 ‘Moneymaker’ 中出现多条不同分子质量的非特异性条带(图 3)。

为了消除 HERO-F9/HERO-R11 引物组合在 ‘Moneymaker’ 样本中的非特异扩增,优化 PCR 反应体系的退火温度。结果如图 4 所示:在退火温度为 56 ℃ 时,抗性品系 ‘LA1792’ 样本中可见 1 条约 700 bp 的特异性条带,而在感病品种 ‘Moneymaker’ 中可见多个模糊条带;随着退火温度的不断升高, ‘LA1792’ 样本中的扩增条带无明显变化,但 ‘Moneymaker’ 样本中的非特异性条带逐渐变弱,当退火温度达到 62 ℃ 时,

在‘Moneymaker’中的扩增条带完全消失,表明 HERO-F9/HERO-R11 引物组合在 62 ℃ 的退火温度条件下,能够在抗性品种中扩增出特异性条带,从而有效区分抗、感品种。

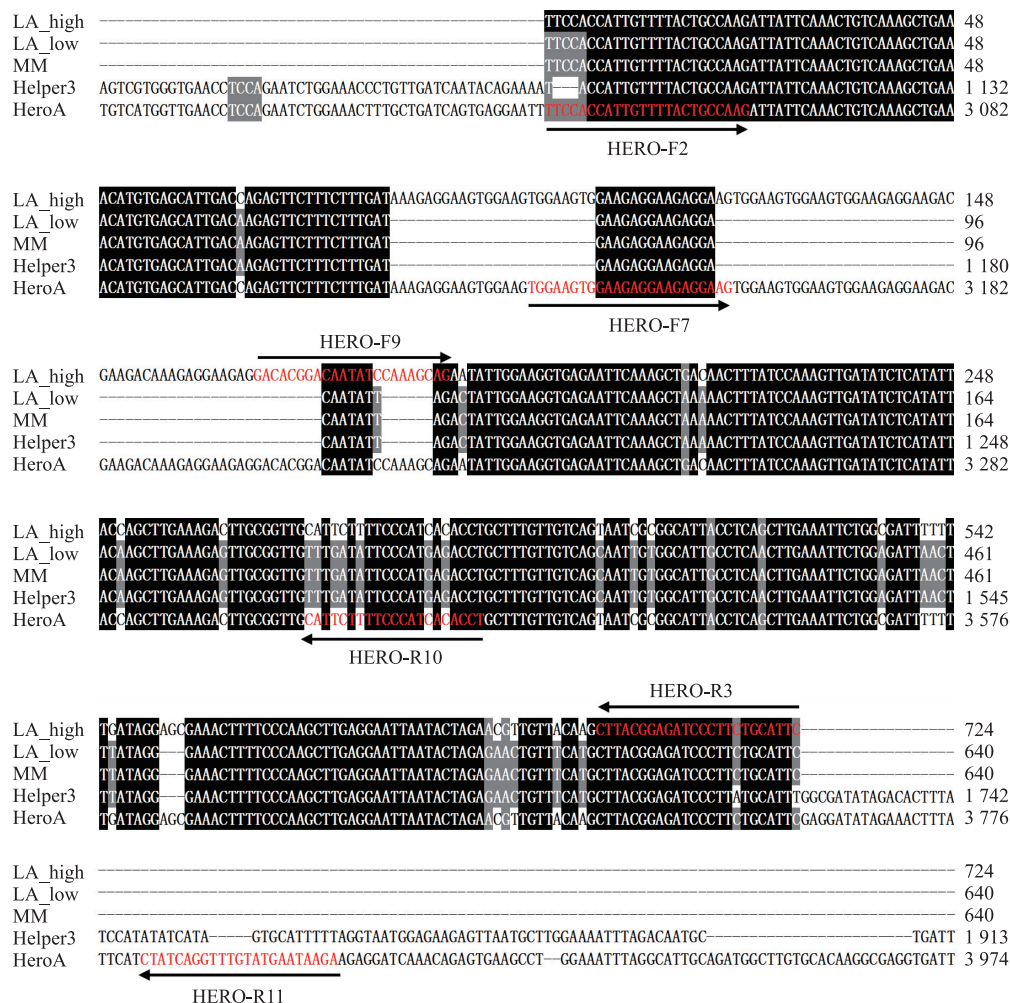


图 2 不同引物组合在抗、感番茄样本中扩增 *HeroA* 基因产物的序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of the amplification products from resistant and susceptible tomato samples using different primers

LA-high: ‘LA1792’ 样本中的高分子质量条带序列; LA-low: ‘LA1792’ 样本中的低分子质量条带序列; MM: ‘Moneymaker’ 样本中的扩增条带序列; Helper3: *Helper3* 序列 (AJ457050); HeroA: *HeroA* 序列 (AJ457051)。

LA-high: Sequence of the high molecular weight band in the ‘LA1792’ sample; LA-low: Sequence of the low molecular weight band in the ‘LA1792’ sample; MM: The sequence of the amplified band in the ‘Moneymaker’ sample; Helper3: The sequence of *Helper3* (AJ457050); HeroA: The sequence of *HeroA* (AJ457051)。

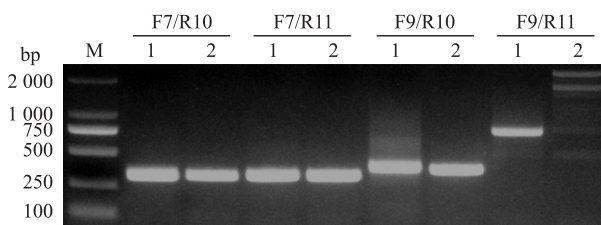


图 3 扩增 *HeroA* 基因的引物组合筛选
Fig. 3 Screening of primer combinations amplifying the *HeroA* gene

M: DL2000 marker; 1. ‘LA1792’ 样本 The sample of ‘LA1792’;
2. ‘Moneymaker’ 样本 The sample of ‘Moneymaker’. 下同 The same below.

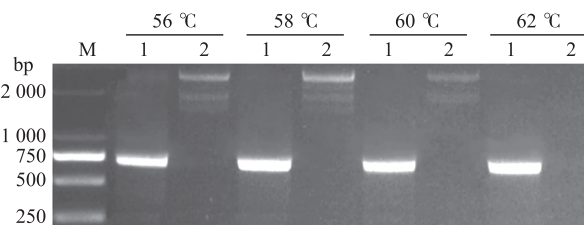


图 4 不同退火温度对 HERO-F9/HERO-R11 引物组合扩增结果的影响
Fig. 4 The effect of different annealing temperatures on the amplification results of the primers HERO-F9/HERO-R11

2.3 *HeroA* 特异性引物灵敏度检测

将抗性品系‘LA1792’的DNA样本进行梯度稀释,用HERO-F9/HERO-R11引物组合分别进行扩增,以检测SCAR-PCR的检测灵敏度。结果(图5)显示:在样本DNA浓度为 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,HERO-F9/HERO-R11引物组合能够扩增出约700 bp的明亮条带;当模板浓度分别稀释至1和 $0.1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,仍能够检测到特异性扩增条带;而当浓度降至 $0.01\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,HERO-F9/HERO-R11引物组合无扩增条带出现,表明F9/R11引物组合检测灵敏度为 0.1 ng 模板DNA。

2.4 不同番茄品种 *HeroA* 检测

利用HERO-F9/HERO-R11引物组合对30个不同番茄品种的DNA样本进行扩增,同时与HERO-F2/HERO-R3引物组合以及RFLP方法进行比较。结果如图6所示:‘红果’‘大红’‘黑金刚’等11个品种均能够扩增出约700 bp的特异性条带,表明上述品种含有马铃薯孢囊线虫抗性基因 *HeroA*;‘黄牛奶’‘黄圣

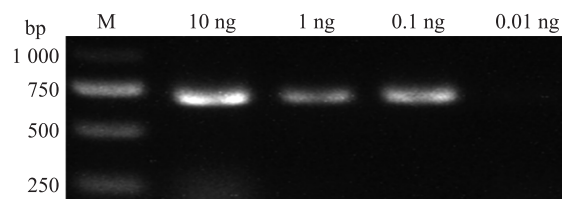


图5 *HeroA* 基因特异性引物 HERO-F9/HERO-R11 检测灵敏度

Fig. 5 The detection sensitivity of primers HERO-F9/HERO-R11 for *HeroA*

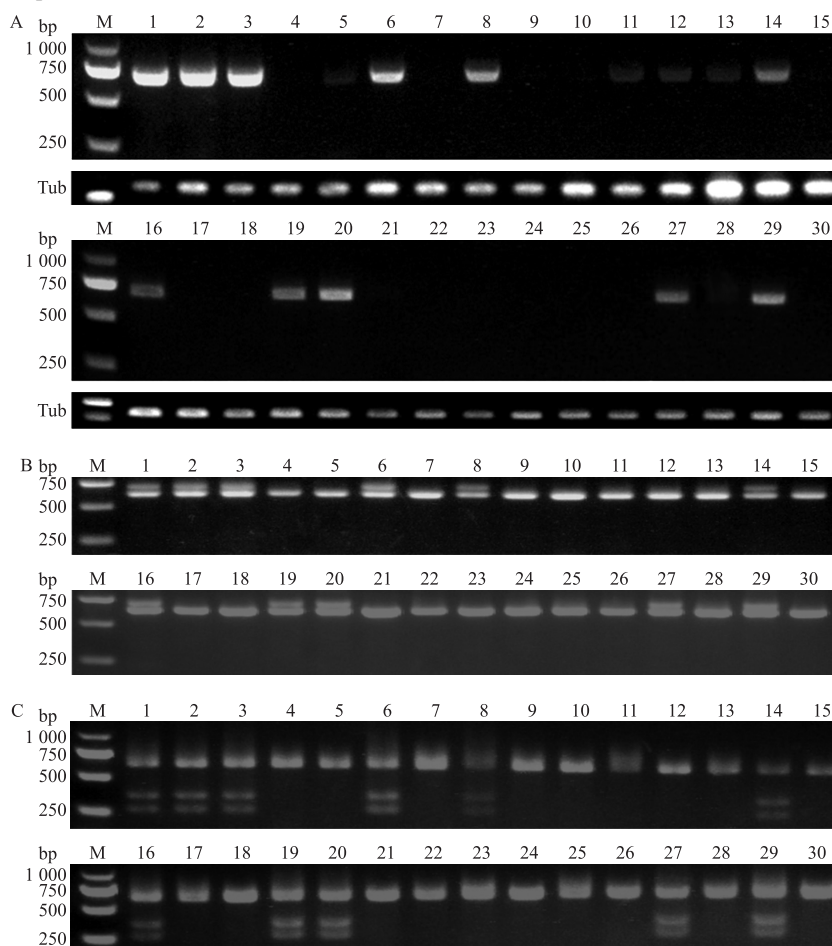


图6 不同方法对30个番茄品种 *HeroA* 基因的分子检测

Fig. 6 Molecular detection of the *HeroA* gene in 30 tomato varieties using different methods

A. HERO-F9/HERO-R11 引物组合; B. HERO-F2/HERO-R3 引物组合; C. RFLP 检测。1. 红果; 2. 大红; 3. 黑金刚; 4. 黄牛奶; 5. 黄圣女; 6. 甜心番茄; 7. 红珍珠; 8. 紫圣女; 9. 荷兰紫; 10. 台湾千禧; 11. 草莓柿子; 12. 中蔬四号; 13. 粉圆圆; 14. 马提尔; 15. 黑多; 16. 贵妃樱桃; 17. 黄贝贝; 18. 小仙桃; 19. 粉秀; 20. 奶油红圣女; 21. 美国大黄; 22. 好味道; 23. 白果强丰; 24. 黑珍珠; 25. 贼不偷; 26. 黄洋梨; 27. 红贝提; 28. 黑玫瑰; 29. SPA; 30. 合作903。

A. HERO-F9/HERO-R11 primer pairs; B. HERO-F2/HERO-R3 primer pairs; C. RFLP method. 1. Hongguo; 2. Dahong; 3. Heijingang; 4. Huangniunai; 5. Huangshengnv; 6. Tianxinfanqie; 7. Hongzhenzhu; 8. Zishengnv; 9. Helanzi; 10. Taiwaqianxi; 11. Caomeishizi; 12. Zhongshushihao; 13. Fenyuan yuan; 14. Matier; 15. Heiduo; 16. Guifeiyingtao; 17. Huangbeibei; 18. Xiaoxiantao; 19. Fenxiu; 20. Naiyouhongshengnv; 21. Meiguodahuang; 22. Haoweidao; 23. Baiguogiangfeng; 24. Heizhenzhu; 25. Zeibutou; 26. Huangyangli; 27. Hongbeiti; 28. Heimeigui; 29. SPARTA; 30. Hezuo903.

女’和‘红珍珠’等 19 个品种均无扩增条带出现,表明其均不含有 *HeroA* 基因,而扩增番茄 β -*tubulin* 内参基因证实所有样本 DNA 均正常(图 6-A);用已报道的 HERO-F2/HERO-R3 引物组合扩增结果显示,‘红果’‘大红’‘黑金刚’等 11 个品种均在 700 bp 左右出现 2 条大小相近的条带,‘黄牛奶’‘黄圣女’和‘红珍珠’等 19 个品种均只检测到 1 条特异性条带(图 6-B);采用 RFLP 方法对上述品种的检测结果显示,‘红果’‘大红’‘黑金刚’等 11 个品种用 HERO-F4/HERO-R6 引物组合扩增并经 *Taq* I 酶切后均产生约 270、360、600 bp 的 3 个片段,而‘黄牛奶’‘黄圣女’和‘红珍珠’等 19 个品种的扩增产物无法被 *Taq* I 酶切(图 6-C)。检测结果(表 2)表明,利用 HERO-F9/HERO-R11 引物组合对 30 个不同番茄品种 *HeroA* 的检测结果与已报道的 2 种方法完全一致,‘红果’‘大红’‘黑金刚’等 11 个品种含有马铃薯胞囊线虫抗性基因 *HeroA*,另外 19 个供试番茄品种不含有 *HeroA* 基因。

表 2 不同番茄品种 *HeroA* 基因的不同方法检测结果

Table 2 The different detection results of the <i>HeroA</i> gene in different tomato varieties									
品种 Cultivar	类型 Type	HERO-F9/ HERO-R11	RFLP	HERO-F2/ R3	品种 Cultivar	类型 Type	HERO-F9/ HERO-R11	RFLP	HERO-F2/ R3
红果	红色小果	+	+	+	贵妃樱桃	红色小果	+	+	+
大红	红色大果	+	+	+	黄贝贝	黄色小果	—	—	—
黑金刚	黑色小果	+	+	+	小仙桃	红色小果	—	—	—
黄牛奶	黄色小果	—	—	—	粉秀	粉色小果	+	+	+
黄圣女	黄色小果	—	—	—	奶油红圣女	红色小果	+	+	+
甜心番茄	红色小果	+	+	+	美国大黄	黄色大果	—	—	—
红珍珠	红色小果	—	—	—	好味道	红色小果	—	—	—
紫圣女	紫色小果	+	+	+	白果强丰	红色大果	—	—	—
荷兰紫	紫色小果	—	—	—	黑珍珠	黑色小果	—	—	—
台湾千禧	红色小果	—	—	—	贼不偷	绿色大果	—	—	—
草莓柿子	粉色大果	—	—	—	黄洋梨	黄色小果	—	—	—
中蔬四号	红色大果	—	—	—	红贝提	红色小果	+	+	+
粉圆圆	粉色小果	—	—	—	黑玫瑰	黑色小果	—	—	—
马提尔	红色大果	+	+	+	SPARTA	红色大果	+	+	+
黑多	灰色大果	—	—	—	合作 903	红色大果	—	—	—

注:“+”表示含有 *HeroA* 基因的番茄品种;“—”表示不含有 *HeroA* 基因的番茄品种。
Note:“+” indicate tomato varieties carrying the *HeroA* gene;“—” indicate tomato varieties lacking the *HeroA* gene.

3 结论与讨论

马铃薯胞囊线虫病是茄科作物上的一类重要病害,在全世界多个国家引起巨大危害,推广种植抗性品种是有效防治该病害的一种手段。目前,已经从马铃薯中成功鉴定到 *H1*、*Gpa2*、*Gro1-4* 等抗胞囊线虫基因,其中 *H1* 基因抗马铃薯金线虫 Ro1 和 Ro4 致病型^[12],*Gpa2* 仅对马铃薯白线虫特定种群具有抗性^[23],而 *Gro1-4* 则主要抗马铃薯金线虫 Ro1 致病型^[24]。*HeroA* 基因是唯一克隆自野生番茄的马铃薯胞囊线虫抗性基因,该基因对马铃薯金线虫所有致病型均具有抗性^[14],具有广泛的应用前景。马铃薯胞囊线虫除了为害马铃薯之外,也为害番茄,在欧洲及亚洲均有马铃薯胞囊线虫影响番茄种植的报道^[17,25]。作为一种近年来新发现的外来有害生物,目前该病害仅出现在我国西南山区的马铃薯田块中^[6-10],目前尚无为害番茄的报道。

为了明确哪些商业化种植番茄品种携带 *HeroA* 基因,Uehara 等^[18]开发了一种 RFLP 分子检测技术,即首先利用引物组合 HERO-F4/HERO-R6 在抗、感品种中扩增出 1 条 600 bp 的条带,之后再利用 *Afa* I、*Alu* I 或 *Taq* I 等限制性内切酶分别对扩增产物进行酶切,通过酶切图谱的差异区分抗、感品种,并且利用该技术对日本种植的 18 个番茄品种进行了检测,发现半数以上品种携带 *HeroA* 基因。为了探究我国哪些商业化种植番茄品种含有 *HeroA* 基因,用此前报道的 2 种分子检测方法进行了测试,结果显示,HERO-F2/HERO-R3 引物组合尽管在抗、感品种中的扩增条带有一定差异,但当扩增条带在电泳过程中产生拖尾时,抗、感病品种的检测结果容易发生混淆;RFLP 检测方法虽然具有较高的辨识度,但操作过程相对繁琐。为了开发一种更高效的 *HeroA* 基因检测技术,通过低电压、高浓度琼脂糖凝胶电泳,将 HERO-F2/HERO-R3 在抗性品种中扩增的 2 条带分别进行回收、克隆和测序,序列比对结果显示该引物组合在抗性品种中能

够同时扩增出 *HeroA* 基因及其同源基因 *Helper3* 两条带,而在感病品种中只有 *Helper3* 的扩增条带。与 *Helper3* 相比,*HeroA* 基因中有 70 多个核苷酸的插入,这也是导致抗病品种扩增条带差异的原因。*HeroA* 是一种典型的含有核苷酸结合结构域和富含亮氨酸重复序列(nucleotide-binding and leucine-rich repeat, NB-LRR)的抗病蛋白^[26-27]。序列分析显示,上述插入序列与此前报道 *HeroA* 蛋白独特的卷曲螺旋相似,该结构使 *HeroA* 成为唯一在 LRR 结构域中含有上述序列的 NBS-LRR 类蛋白^[28]。因此,本研究以该区域序列为模板,最终成功获得了能够特异性扩增 *HeroA* 基因的引物组合。但该引物组合在 56 ℃ 退火温度下,在感病番茄品种中有非特异性扩增条带,当退火温度提升到 62 ℃ 时,非特异性扩增条带能够完全消失。

马铃薯金线虫目前仅在我国局部地区被发现,其潜在的传播扩散风险不容忽视。抗性品种选育及其合理布局对于限制马铃薯胞囊线虫病传播具有重要的意义。明会等^[29]利用 6 个不同分子标记对 875 份马铃薯种质资源进行了鉴定,其中 211 份材料检测到了 *H1*,237 份材料检测到 *Gpa2* 分子标记,7 份材料中检测到 *Gro1-4*。黄立强等^[30]利用分子标记 57R 和 TG689 对 15 个马铃薯主栽品种进行了测试,结果表明‘云薯 505’‘宣薯 5 号’‘会薯 15 号’‘云薯 304’和‘宣薯 6 号’5 个品种有马铃薯金线虫抗性基因 *H1*。本研究首次利用 3 种不同的分子检测标记对 30 个番茄品种进行了测试,结果显示‘红果’‘大红’‘黑金刚’等 11 个品种中含有 *HeroA* 基因。由于该基因目前尚不是品种选育的主要靶标,我们推测 *HeroA* 基因可能与其他番茄重要基因或优异性状存在连锁,因此在品种选育过程中得到保留。

综上所述,本研究建立了一种新的 SCAR-PCR 检测方法,能够在含有马铃薯胞囊线虫抗性基因 *HeroA* 的样本中产生特异性扩增条带。此外,本研究利用不同方法证实我国多个主栽番茄品种含有 *HeroA* 基因,这些品种可以在马铃薯胞囊线虫病发生区域推广种植,有望成为抗病育种过程中新品种选育的抗原材料。

参考文献 References:

- [1] Price J A, Coyne D, Blok V C, et al. Potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* [J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22(5): 495–507.
- [2] Moxnes J F, Hausken K. The population dynamics of potato cyst nematodes [J]. Ecological Modelling, 2007, 207(2/3/4): 339–348.
- [3] Varandas R, Egas C, Conceição I L. Potato cyst nematodes: new solutions to an old problem [J]. Crop Protection, 2020, 137: 105303.
- [4] 农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第 351 号 [EB/OL]. (2020-11-04) [2022-06-25]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-11/12/content_5560727.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Announcement No. 351 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. [EB/OL]. (2020-11-04) [2022-06-25]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-11/12/content_5560727.htm (in Chinese).
- [5] Orlando V, Boa E. Potato cyst nematodes: a persistent and fearsome foe [J]. Plant Pathology, 2023, 72(9): 1541–1556.
- [6] Peng D L, Liu H, Peng H, et al. First detection of the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) in a major potato production region of China [J]. Plant Disease, 2022, 107(1): 233.
- [7] Jiang R, Peng H, Li Y Q, et al. First record of the golden potato nematode *Globodera rostochiensis* in Yunnan and Sichuan Provinces of China [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(3): 898–899.
- [8] Jiang R, Li Y Q, Huang L Q, et al. Association of *Globodera rostochiensis* (Nematoda) with stunted and chlorotic potato plants in Yunnan and Sichuan Provinces in China [J]. Plant Disease, 2023, 107(4): 1027–1034.
- [9] 邓春菊, 李艳, 杨毅娟, 等. 云南省马铃薯胞囊线虫种类鉴定 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(3): 400–408.
Deng C J, Li Y, Yang Y J, et al. Identification of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*) on potato in Yunnan Province [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2023, 38(3): 400–408 (in Chinese with English abstract).
- [10] 顾建锋, 邵宝林, 方亦午, 等. 四川省马铃薯胞囊线虫的形态和分子鉴定 [J]. 福建农业学报, 2022, 37(4): 520–528.
Gu J F, Shao B L, Fang Y W, et al. Morphological and molecular identification of potato cyst nematode from Sichuan [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(4): 520–528 (in Chinese with English abstract).
- [11] Sukhanova A A, Boyandin A N, Ertiletskaya N L. Potato cyst nematode management strategies: current situation and promising approaches [J]. ACS Agricultural Science & Technology, 2022, 2(3): 415–425.
- [12] Bakker E, Achenbach U, Bakker J, et al. A high-resolution map of the H1 locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 146–152.
- [13] Gartner U, Hein I, Brown L H, et al. Resisting potato cyst nematodes with resistance [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 661194.
- [14] Ellis P R, Maxon Smith J W. Inheritance of resistance to potato cyst-eelworm (*Heterodera rostochiensis* Woll.) in the genus *Lycopersicon* [J]. Euphytica, 1971, 20: 93–101.
- [15] Ganai M W, Simon R, Brommonschenkel S, et al. Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (*Hero*) against *Globodera rostochiensis* in tomato [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(6): 886–891.
- [16] Uehara T, Ito K, Narabu T. Differences in parasitism of potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, to tomato varieties and strains of relative

- wild species[J]. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 2008, 52(3): 146–148.
- [17] Cabrera P H L, Manzanilla López R H, Kanyuka K. Functionality of resistance gene *Hero*, which controls plant root-infecting potato cyst nematodes, in leaves of tomato[J]. Plant, Cell & Environment, 2006, 29(7): 1372–1378.
- [18] Uehara T, Narabu T, Ito K, et al. Detection of the potato cyst nematode resistance gene *Hero A* in Japanese tomato cultivars by the PCR-RFLP method[J]. Nematological Research, 2015, 45(2): 115–120.
- [19] 申恒, 刘思慧, 李跃, 等. 一种用于 PCR 的番茄 DNA 快速粗提方法[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 74–80.
Shen H, Liu S H, Li Y, et al. Rapid crude extraction of genomic DNA from *Solanum lycopersicum* for PCR[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 74–80 (in Chinese with English abstract).
- [20] Løvdal T, Lillo C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 387(2): 238–242.
- [21] Benson D A, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(1): 41–47.
- [22] 黄骥, 张红生. 基于 Windows 的核酸序列分析软件的开发[J]. 生物信息学, 2004, 2(1): 13–17.
Huang J, Zhang H S. Development of nucleotide sequence analysis software based on windows [J]. Bioinformatics, 2004, 2(1): 13–17 (in Chinese).
- [23] van der Vossen E A, van der Voort J N, Kanyuka K, et al. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode[J]. The Plant Journal, 2000, 23(5): 567–576.
- [24] Paal J, Henselewski H, Muth J, et al. Molecular cloning of the potato *GroI-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach[J]. The Plant Journal, 2004, 38(2): 285–297.
- [25] Trifonova Z L, Sotirova V, Voulkova Z L. Resistance of wild tomato species to *Globodera rostochiensis* [J]. Nematologica, 1995, 41(1): 141–142.
- [26] Dangl J L, Jones J D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection[J]. Nature, 2001, 411(6839): 826–833.
- [27] 刘云飞, 万红建, 李志邈, 等. 植物 NBS-LRR 抗病基因的结构、功能、进化起源及其应用[J]. 分子植物育种, 2014, 12(2): 377–389.
Liu Y F, Wan H J, Li Z M, et al. Analysis of plant *NBS-LRR* resistance gene: structure, function, origin, evolution and their application [J]. Molecular Plant Breeding, 2014, 12(2): 377–389 (in Chinese with English abstract).
- [28] Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, et al. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region[J]. The Plant Journal, 2002, 31(2): 127–136.
- [29] 明会, 蒋伟, 刘太红, 等. 利用分子标记筛选马铃薯抗胞囊线虫资源[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(4): 1194–1204.
Ming H, Jiang W, Liu T H, et al. Molecular markers assisted identification of potato resources resistant to cyst nematode [J]. Journal of Plant Genetic Resources. 2023, 24(4): 1194–1204 (in Chinese with English abstract).
- [30] 黄立强, 江如, 朱波汁, 等. 马铃薯主栽品种抗马铃薯金线虫鉴定及抗性分子标记检测[J]. 中国农业科学, 2024, 57(8): 1506–1516.
Huang L Q, Jiang R, Zhu B Z, et al. Identification and evaluation of major potato cultivars resistance to *Globodera rostochiensis* and detection of their *HI* resistance gene marker [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2024, 57(8): 1506–1516 (in Chinese with English abstract).

责任编辑: 刘怡辰