

# 宁夏枣疯病植原体分子检测

魏天军<sup>1</sup>, 吴云峰<sup>2</sup>, 李百云<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院 种质资源研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 西北农林科技大学 植物保护学院 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 运用国际上通用的植原体 16S rRNA 基因分子检测技术, 对原产宁夏灵武市的灵武‘长枣品种’、‘灵武长枣 1 号’、‘灵武长枣 2 号’、‘灵武长枣 3 号’、‘灵武长枣 4 号’、‘灵武长枣 5 号’; 原产宁夏中卫市的‘中卫大枣’和‘同心圆枣’和引进品种‘金昌 1 号’、‘敦煌大枣’(‘哈密大枣’)等 10 个品种品系样品的总 DNA 进行了巢式 PCR 扩增, 结果这些材料没有携带枣疯病植原体, 可以为飞速发展的宁夏枣产业繁育无毒优良品种苗木提供科技支撑。

**关键词:** 枣; 枣疯病; 植原体; 分子检测; 宁夏回族自治区

**中图分类号:** S 665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009-(2010)11-0158-03

枣疯病的病原旧称类菌原体, 1994 年第十届国际菌原体组织大会上改称为植原体。植原体属于柔膜菌纲、植原体属, 是一类无坚固细胞壁、存在于植物韧皮部筛管细胞内的原核生物。枣疯病是枣树生产中发生最普遍、危害最严重的毁灭性传染病害。目前, 已遍及中国的冀、晋、秦、鲁、豫等枣区, 一般病株率达 5% 左右, 有的枣园高达 30% 以上。枣树一旦患病, 通常 2~3 a 内丧失产量并很快导致死亡。因此, 枣疯病俗称枣树的“癌症”和“艾滋病”<sup>[1-2]</sup>。

最早, 人们是通过田间症状表现来判断枣疯病的。20 世纪 70 年代, 韩国和中国的学者将电镜技术用于枣疯病原物的鉴定<sup>[3-4]</sup>。20 世纪 80 年代以后, 对植原体灵敏度高、特异性强, 能在一定程度上反应植原体密度的 DAPI<sup>[4]</sup>、6-二脒基-2-苯基吡啶盐酸)荧光染色法被广泛用于枣疯病植原体的快速检测<sup>[5-7]</sup>。韩国安<sup>[8]</sup>采用枣疯病原单克隆抗体对枣疯病叶片的检测, 通过间接 ELISA 法筛选出对枣疯病原具有特异性反应的单克隆抗体细胞株, 可准确、快速地检测到枣疯病原。王宇<sup>[9]</sup>利用泡桐丛枝病原 DNA 片段作探针, 采用核酸点印迹杂交法对枣疯病植原体做出了有效检测, 检测精度为 2.56 ng。20 世纪 90 年代以来, 随着分子生物学的快速发展, PCR 技术也被广泛应用到植原体的检测上。何放亭等<sup>[10]</sup>在国内首次用 PCR 技术检测了枣疯病的植

原体。

枣疯病植原体的 PCR 检测技术是基于植原体高度保守的 16S rDNA 基因序列设计通用引物, 植原体 16S rDNA 通过 PCR 扩增, 然后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。采用巢式 PCR 技术, 对原产宁夏的枣树品种品系和引入宁夏的 2 个枣树品种, 从分子水平就枣疯病植原体进行检测, 旨在为宁夏 9.33 万 hm<sup>2</sup> 枣树产业的健康、持续发展、为繁育优良品种无病毒苗木提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2009 年, 在西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室进行。供检测的‘灵武长枣’、‘灵武长枣 1 号’、‘灵武长枣 2 号’、‘灵武长枣 3 号’、‘灵武长枣 4 号’、‘灵武长枣 5 号’品种品系来自宁夏灵武市; ‘中卫大枣’和‘同心圆枣’来自宁夏中卫市; ‘哈密大枣’和‘金昌 1 号’来自山西农科院果树研究所。每个品种品系选 3~5 株, 取新枣头 2 次枝嫩尖和枣吊嫩叶片。枣疯病样品(JWB)采集于杨凌, 该实验室保存; 苦楝丛枝样品(KL)采集于海南, 该实验室保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 提取方法** DNA 提取采用 CTAB 法, 取枣树叶片 0.2 g, 在液氮中充分研磨, 加入 0.4 mL DNA 提取缓冲液(2% CTAB、1.4% mol/L NaCl、100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、50 mmol/L EDTA pH 8.0)、0.5 mL 的氯仿: 异戊醇(24:1)、0.08 mL PVP(2%)、0.012 mL  $\beta$ -巯基乙醇, 在 65℃水浴中保温 30 min, 冷却至室温后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 再用等体积的氯仿: 异戊醇抽提至蛋白除尽。上清液加入等体积的异丙醇沉淀 DNA, 室温下静置 15~20 min, 沉淀经 70% 乙醇洗涤 2 次, 干燥后, 溶于 30  $\mu$ L TE 中, -20℃冰冻保存。

**第一作者简介:** 魏天军(1965-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事枣树学与果品采后生理及贮藏保鲜研究工作。E-mail: wtjunnx@163.net

**基金项目:** 宁夏 5183 农业工程重大专项资助项目 编号(5183010)。

**收稿日期:** 2010-03-05

1.2.2 引物及PCR反应条件 参照 Lee 等(2000)根据植原体 16S r DNA 基因片段序列设计的引物对 R16mF2/ R16mR1 和 R16F2n/ R16R2(南京金思特公司合成)进行 PCR 扩增。直接 PCR 所用引物对为 R16mF2/ R16mR1,反应体系含 25  $\mu$ L PCR 标准反应体系: 12.3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer [ 750 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8), 200 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20], 2  $\mu$ L 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L dNTP(各 2.5 mmol/L), 2  $\mu$ L 正向和反向引物混合物(各 10  $\mu$ mol/L), 0.2  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)和 2  $\mu$ L DNA 模板。反应循环为 94 $^{\circ}$ C 预处理 3 min, 变性温度 94 $^{\circ}$ C 复性温度 52 $^{\circ}$ C, 延伸温度 72 $^{\circ}$ C, 共 30 个循环。前 5 个循环变性 1 min, 复性 1 min, 延伸 2 min; 后 25 个循环变性 30 s 复性 1 min, 延伸 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将直接 PCR 产物稀释 30 倍后为模板进行巢式 PCR, PCR 反应体系和反应条件同直接 PCR, 所用引物对为 R16F2n/ R16R2。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 紫外灯下检查有无 1.2 kb 的特异扩增片段, 并拍照记录试验结果。

2 结果与分析

对宁夏灵武的 5 个灵武长枣品种品系及‘灵武长枣 2 号’、中卫的‘中卫大枣’和‘同心圆枣’, 以及引入宁夏‘敦煌大枣’(‘哈密大枣’)和 金昌 1 号 样品总 DNA 进行了巢式 PCR 扩增(图 1), 结果表明, 10 个样品 DNA 的 PCR 扩增产物均没有 1.2 kb 左右的特异性片段, 属于阴性反应, 均未感染枣疯病, 而枣疯病样品和苦楝丛枝样品扩增出了特异性条带。

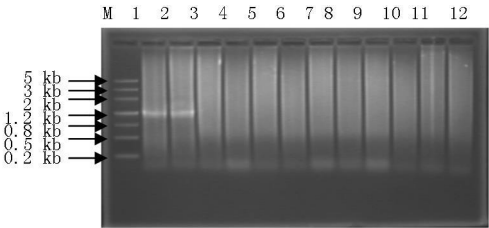


图 1 植原体 16S rDNA 巢式 PCR 扩增产物凝胶电泳

注: M 为 Marker IV; 1 为阳性对照(JWB); 2 为阳性对照(KL); 3 ~ 12 依次为‘中卫大枣’、‘灵武长枣’、‘灵武长枣 1 号’、‘灵武长枣 2 号’、‘灵武长枣 3 号’、‘灵武长枣 4 号’、‘灵武长枣 5 号’、‘哈密大枣’、‘同心圆枣’、‘金昌 1 号’。

3 讨论

3.1 关于枣疯病的传播途径

早在 1980 年, La Y J 报道枣树种子不传染枣疯病<sup>[1]</sup>。陈子文等<sup>[2]</sup>进一步研究证实枣树和酸枣种子均不传病, 病健树间通过汁液摩擦接种、授粉、根系间的自然接触、土壤都不能传病。病株根蘖繁殖<sup>[13]</sup>、病穗或病砧嫁接<sup>[12,13]</sup>、凹缘菱纹叶蝉 *Hishimonus sellatus* Uhler (RLH)<sup>[14]</sup>、中华拟菱纹叶蝉 (*Hishimonoides chinensis*)<sup>[15]</sup> 和广西的片突菱纹叶蝉均能传病。

3.2 关于宁夏培育无病毒枣树苗木的问题

截至 2009 年底, 宁夏枣树总面积近 4 万  $\text{hm}^2$ , 但在本世纪之前, 宁夏的枣树面积和产量在全国所占的比重一直很低, 2003 年之前, 全区枣树总面积不足 0.53 万  $\text{hm}^2$ , 主要分布在中宁、中卫和灵武 3 个县(市)<sup>[16]</sup>。因此, 可以说宁夏是一个新兴的枣树产区。从新中国成立到现在, 在生产中没有发现原产宁夏的 5 个枣树品种(‘宁夏长枣’、‘宁夏圆枣’、‘中宁大红枣’、‘中卫大枣’和‘彭阳枣’)<sup>[17]</sup> 表现出枝叶丛生, 花器返祖变枝叶, 果小、瘦、呈花脸, 根部出现点发性溃疡斑的枣疯病症状。这可能与宁夏地处祖国内陆冷凉地区, 以及宁夏农林业生态环境不适合传病叶蝉的生存等有关。因此, 播种酸枣核或酸枣仁, 培育酸枣砧木, 选用检测过的品种品系的接穗或相同品种生长发育健壮树体的接穗, 进行嫁接, 就能繁育出无枣疯病的优良苗木。但对引入宁夏的品种尤其是从枣疯病发生较严重的地区引入的品种, 一定要采用该方法进行检测, 以免外来带病的品种在飞速发展的宁夏枣产业中埋下祸种。

4 结论

原产宁夏灵武市的‘灵武长枣’、原产中卫市的‘中卫大枣’和‘同心圆枣’, 和引入宁夏的‘金昌 1 号’、‘敦煌大枣’(‘哈密大枣’)不携带枣疯病植原体。

参考文献

[ 1 ] 刘仲建 罗洪亮 张景宁. 植原体病理学[ M ]. 北京: 中国林业出版社 1998: 34-36.  
[ 2 ] 潘清华. 枣疯病研究进展及防治措施[ J ]. 北京农业科学, 2002(3): 4-8, 21.  
[ 3 ] Yi C K, La Y J. Mycoplasma-like bodies found in the phloem elements of jujube trees infected with witches'-broom disease[ J ]. Research Reports of the Forest Research Institute of Korea, 1973 20: 111-114.  
[ 4 ] 陈作义 沈菊英 隆祖驹, 等. 枣疯病病原体的电子显微镜研究[ J ]. 科学通报, 1978(12): 751.  
[ 5 ] Bake W C, La Y J. Fluorescence microscopic diagnosis of mycoplasma infections in jujube, mulberry and periwinkle plants [ J ]. Korean J Plant Pathol, 1985(1): 12-16.  
[ 6 ] 田砚亭, 王红艳, 牛辰, 等. 枣树脱除类菌原体(MLO)技术的研究[ J ]. 北京林业大学学报, 1993 15(2): 20-26.  
[ 7 ] 郭晓军 田国忠 赵少波, 等. 抗枣疯病枣树品种的 DAPI 荧光染色检测[ J ]. 河北林业科技, 2003(8): 1-3.  
[ 8 ] 韩国安 郭永红 陈永萱, 用单克隆抗体检测枣疯病类菌原体[ J ]. 南京农业大学学报, 1990 13(1): 123.  
[ 9 ] 王宇. 核酸点印迹杂交法检测枣疯病植原体[ J ]. 河北林业科技, 2002 (3): 1-3.  
[ 10 ] 何放亭, 吴红巾 陈子文, 等. 几种植物类菌原体的分子检测及其遗传相关性比较[ J ]. 植物病理学报, 1996 26(3): 251-255.  
[ 11 ] La Y J, Woo K S. Transmission of jujube witches'-broom mycoplasma by the leafhopper (*Hishimonos sellatus* Uhler)[ J ]. J Korean For Soc, 1980 48: 39.

# 红叶石楠‘红罗宾’离体再生技术研究

陈泽雄, 刘奕清, 黄登艳

(重庆文理学院 花卉研究所, 重庆高校园林花卉工程研究中心 重庆 永川 402160)

**摘要:**以红叶石楠‘红罗宾’的茎段为外植体建立再生体系。结果表明:适宜的诱导培养基为 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 增殖系数可达 3.0; 红叶石楠瓶外生根适宜的方案为:以草炭土为基质, 插条在 500 mg/L 的生长素中浸泡 10 s, 生根率可达 94.2%。

**关键词:** 红叶石楠 离体培养; 植株再生

**中图分类号:** S 687.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0160-03

红叶石楠‘红罗宾’是蔷薇科石楠属杂交种, 为常绿小乔木, 因其具鲜红色的新梢和嫩叶而得名<sup>[1]</sup>。‘红罗宾’是近年来大力开发的绿化新树种, 其生态适应性强, 耐低温、耐盐碱和干旱, 被认为具有广泛的应用前景, 市场需求量较大<sup>[2]</sup>。利用组织培养技术可以在短期内获

得大量性状一致的商品化苗木, 近年来有关红叶石楠的组培快繁研究已取得一定进展, 但规模化生产尚未见报道, 其主要原因是生根数少, 生根率低, 导致移栽成活率不高。该研究在红叶石楠增殖体系建立的基础上, 应用了瓶外生根的方法, 简化了生产环节且实现了工厂化育苗, 为解决目前红叶石楠种苗的需要提供了一条十分有效的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以红叶石楠‘红罗宾’的当年生半木质化嫩茎为外植体, 由重庆文理学院花卉研究所温室大棚提供。

**第一作者简介:** 陈泽雄(1979-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事植物组织培养及细胞工程研究工作。E-mail: chenzexiong1979@163.com.

**基金项目:** 重庆市教委能力创新建设资助项目(GCZX0713)。

**收稿日期:** 2010-03-11

[12] 陈子文, 张凤舞, 田旭东, 等. 枣疯病传播途径的研究[J]. 植物病理学报, 1984, 14(3): 142-148.

[13] 田国忠, 张志善, 李志清, 等. 我国不同地区枣疯病发生动态和主导因子分析[J]. 林业科学, 2002, 38(2): 83-91.

[14] 洪淳祐, 金钟镇. 枣疯病的研究(1)—患病植物的内外形态学特征及其命名[J]. 韩国植物学会志, 1960, 3(1): 32-38.

[15] 王焯. 枣疯病几个有关问题[J]. 落叶果树, 1995(4): 8-10.

[16] 魏天军. 枣树优质高效生产技术[M]. 银川: 黄河出版传媒集团, 2009: 15-20.

[17] [曲泽洲]. 王永惠. 中国果树志·枣卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 279, 421, 458, 368, 281.

## Molecular Detection of Phytoplasma of Jujube Witches Broom in Ningxia Autonomous Region

WEI Tian-jun<sup>1</sup>, WU Yun-feng<sup>2</sup>, LI Bai-yun<sup>1</sup>

(1. Institute of Gemplasm Resource, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. College of plant protection, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shanxi 712100)

**Abstract:** Use of international common phytoplasma 16S rRNA gene molecule detection technology, the origin of Ningxia Lingwu city of Lingwuchangzao jujube varieties Lingwuchangzao No 1, Lingwuchangzao No 2, Lingwuchangzao No 3, Lingwuchangzao No 4, Lingwuchangzao No 5; origin Zhongwei in Ningxia Zhongwei City jujube varieties ‘Tongxinyuanzao’, ‘Zhongweidazao’ and introduced varieties ‘Jinchang No 1’, ‘Dunhuangdazao’ (Jujube Hami) in 10 samples of species, the total DNA was amplified by nested PCR. The results showed that these materials do not carry phytoplasma of jujube witches broom, the rapid development of Ningxia Jujube seedlings nursery non-toxic varieties provide a scientific and technological support.

**Key words:** Jujube; jujube witchesbroom; phytoplasma; molecular detection; Ningxia Autonomous Region