

# 枣树植原体快速 PCR 检测体系研究

高静涛, 牛建新, 王雪莲, 刘娜, 叶春秀, 张飞

(石河子大学 农学院园艺系, 新疆 石河子 832000)

**摘要:**依据已获得的 16S rDNA 序列,通过 BLAST 和 DNAMAN 软件分析其同源性,找到其保守序列,并设计出 NTF1/NTR1、NTF2/NTR1、NTF3/NTR1、NTF1/NTR2、NTF2/NTR2、NTF3/NTR2 共 5 对引物序列,通过优化,筛选出了适宜的 PCR 检测体系,通过检测验证,该体系能很好地应用于枣疯病植原体的检测。利用优化的检测体系对新疆部分样品进行检测,发现灰枣品种的个别样品携带植原体。

**关键词:**枣疯病;植原体;检测

**中图分类号:** S 665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)11-0109-04

枣树原产我国,至今拥有数千年的栽培历史。然而,枣疯病却成为制约枣产业发展的关键因素,是一种毁灭性的枣树病害。在我国,枣区疯株率已经达到 10%~30%,严重区竟高达 70%~80%,甚至部分枣区全片毁灭<sup>[1-3]</sup>。由于植原体不能纯化,而且存在季节分布差异,以及组织分布不均匀,严重制约枣疯病的研究,目前依旧没有找到比较有效的根治方法<sup>[4-5]</sup>。随着分子技术的发展,枣疯病的研究得到快速发展<sup>[6-7]</sup>。现以枣树植原体的 16S rDNA 为基础,通过寻找合适的 PCR 检测体系,建立枣疯病快速检测体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

分别在 2009 年 7 月在陕西和山西采取具有枣疯病症状的植株,在石河子大学试验站采取健康植株,在新疆随机采取梨枣、灰枣、金丝小枣、冬枣等样品,保存在 -70℃ 冰箱里。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 的提取** 参照牛建新等关于核桃 DNA 提取的方法,提取样品总 DNA<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 设计引物** 根据已获得 16 S rDNA 的部分片段(登录号:GU574807),通过 BLAST 分析片段,得到具有较高同源性的片段 100 多条,通过 DNAMAN 软件分析片段,获得保守序列,用 Primer 5 对设计检测引物(表

1)<sup>[9-10]</sup>。

**表 1 PCR 扩增 16S rDNA 基因所用引物的核苷酸序列**

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃
NTF1	ACTGCTTTCGGGTATTGCTAAC	58
NTF2	ATTGGCAGTCTCGTAAAGTCC	60
NTF3	GGGTTGCGTTCGTTTATAGACT	60
NTR1	TGACGGGACTCCGCACAAGC	63
NTR2	GACGAGGATAACAATCGGAAACGGT	61

**1.2.3 PCR 检测体系** 将表 1 引物进行组合见表 2(引物通过上海生工技术有限公司生成)。对带病植株和健康植株进行 PCR 扩增,反应体系如下:反应体系为 20 μL,含有 2 μL 10×PCR Buffer,1 μL 20 μmol/L 引物 R16 mF2、1 μL 20 μmol/L 引物 R16 mR1、0.8 μL 0.25 U dNTP、0.2 μL 1.25 U Taq DNA 聚合酶(上海生工公司),2 μL 枣树总 DNA,13 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序:94℃ 预变性 4 min,94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 1 min 35 个循环,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(EB 染色)<sup>[11-12]</sup>,紫外透射仪下观察,并拍照记录试验结果。

**表 2 PCR 扩增 16S rDNA 基因所需引物对**

引物名称	预计扩增片段大小/bp	退火温度/℃
NTF1/NTR1	518	59
NTF2/NTR1	242	60
NTF3/NTR1	190	61
NTF1/NTR2	1 297	60
NTF2/NTR2	1 021	60
NTF3/NTR2	969	60

**1.2.4 克隆测序** PCR 回收产物与百泰克 pmd19-7 连接转化涂板,通过碱式裂解法提取质粒 DNA,并进行单双酶切以及 PCR 的验证,送上海生工进行测序。

**1.2.5 PCR 检测浓度** 分别对总 DNA 进行稀释 10、20、30、40、50 倍后,进行 PCR 检测。

**1.2.6 新疆枣树检测** 通过 NTF3/NTR1 对新疆随机

**第一作者简介:**高静涛(1985-),男,在读硕士,现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail:sxwdza923@126.com。

**责任作者:**牛建新(1962-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事果树与生物技术研究工作。E-mail:njx105@163.com。

**基金项目:**石河子大学重点科技攻关资助项目(gxjs2010-zdgg05-03)。

**收稿日期:**2011-03-28

采取梨枣、灰枣、金丝小枣、冬枣等样品,确定新疆是否有枣疯病植株。

## 2 结果与分析

## 2.1 引物设计

通过已获得的 16S rDNA 的 1 432 bp 片段(登录号: GU574807)进行 Blast 分析,获得 100 条 16S rDNA。运用 DNAMAN 软件,分析这些片段,获得保守序列(图 1),设计的引物如图 1 带框位置,其中 NTF1、NTF2、NTF3 为正向引物,NTR1 和 NTR2 为反向引物,在设计引物的时候,有些片段虽然比较适合 PCR 扩增,但是由于在 Primer-BLAST 检测引物是会有非植原体序列的扩增,比如 Uncultured bacterium, Peptoniphilus sp, francisella tularensis strain 等的 16S rDNA 片段。筛选出 TF1、NTF2、NTF3、NTR1 和 NTR2 为检测体系的引物,并且通过组合形成表 2 所示序列<sup>[13]</sup>。



图 1 枣疯病植原体 16S rDNA 部分序列

注:划线部分为枣疯病植原体 16S rDNA 保守序列,括号位置为引物位置。

2.2 PCR 检测体系 通过引物 NTF1/NTR1、NTF2/NTR1、NTF3/NTR1、NTF1/NTR2、NTF2/NTR2、NTF3/NTR2 PCR 在患病植株中扩增出预计大小的条带,而健康植株中和水中均不能扩增出此特异性片段,说明这些引物均可以应用在植原体检测之中(图 2)。但是在这些引物中,NTF3 /NTR1、NTF2/NTR1 引物相对来说扩增片段短,易造成假阳性,所以 NTF1/ NTR1、NTF2 /NTR2、NTF1/NTR2、NTF3/NTR2 这 4 对引物可以作为枣疫病检测中。

### 2.3 克隆测序

将获得的片段克隆之后,送上海生工进行测序,测序结果表现出其中 NTF1/NTR1、NTF2 /NTR1、NTF3/NTR1、NTF1/NTR2、NTF3/NTR2 的测序结果与 GU574807 序列的同源性达到 100%,只有 NTF2/NTR2 中只有 1 个碱基不同,这些结果均说明所检测样品中的 DNA 片段就是植原体片段,这种 PCR 检测植原体的方法是可靠的<sup>[14]</sup>。

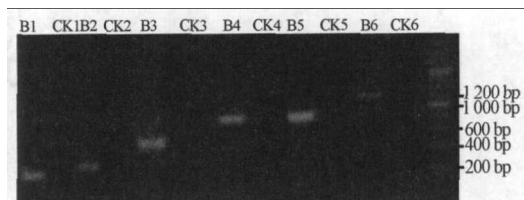


图2 枣疯病植株总DNA的PCR产物电泳图谱

注:B1:引物 NTF3 /NTR1 的 PCR 产物;B2:引物 NTF2 /NTR1 的 PCR 产物;B3:引物 NTF1/ NTR1 的 PCR 产物;B4:引物 NTF3/ NTR2 的 PCR 产物;B5:引物 NTF2/NTR2 的 PCR 产物;B6:引物 NTF1/NTR2 的 PCR 产物;CK1:健康植株的 PCR 结果;CK2:健康植株的 PCR 结果;CK3:健康植株的 PCR 结果;CK4:健康植株的 PCR 结果;CK5:健康植株的 PCR 结果;CK6:健康植株的 PCR 结果。

## 2.4 PCR 检测浓度

提取 DNA 之后,检测其浓度为  $563.1 \text{ mg}/\mu\text{L}$ 。分别对总 DNA 进行稀释 10、20、30、40、50 倍后,对应的 DNA 浓度分别为  $56.5$ 、 $20.1$ 、 $16.2$ 、 $14.6$ 、 $8.7 \text{ mg}/\mu\text{L}$ <sup>[15]</sup>。分别用 NTF1/NTR1、NTF2/NTR1、NTF1/NTR2、NTF3/NTR2 对其进行检测,结果见图 5,说明随着枣疯病枣树总 DNA 浓度的减小,对于枣疯病检测几乎没有影响,说明此种检测方法是比较灵敏的,是一种比较优良的枣疯病检测体系<sup>[16]</sup>。

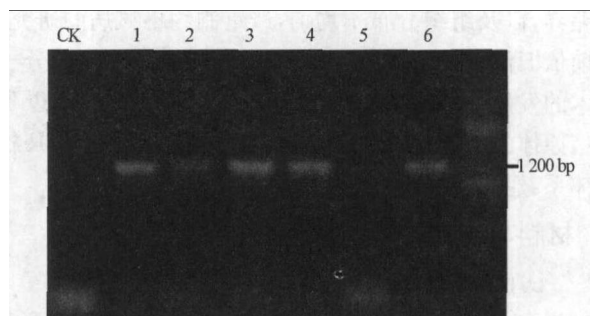


图 3 经引物 NTF1/ NTR1 PCR 扩增结果 NTF1/NTR1

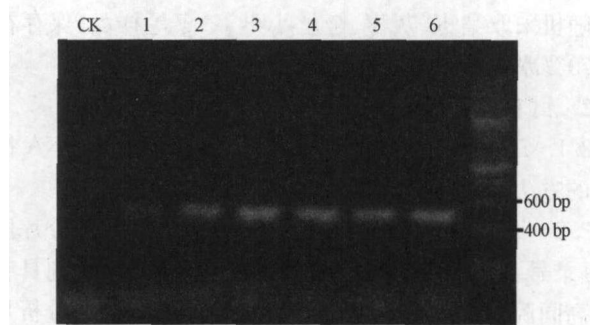


图 4 经引物 NTF1/NTR2 PCR 扩增结果 NTF1/NTR2

### 2.5 新疆枣树田间样品检测结果

通过 NTF3/NTR2 对新疆随机采取梨枣、灰枣、金丝小枣、冬枣等样品进行检测,检测结果见表 3。其中在喀什地区采取的骏枣和在库尔勒地区采取的骏枣和脆枣里面中检测出有枣疯病。说明新疆已经存在枣疯病,所以必须加大枣树苗木检测技术,把枣疯病杜绝在源头。

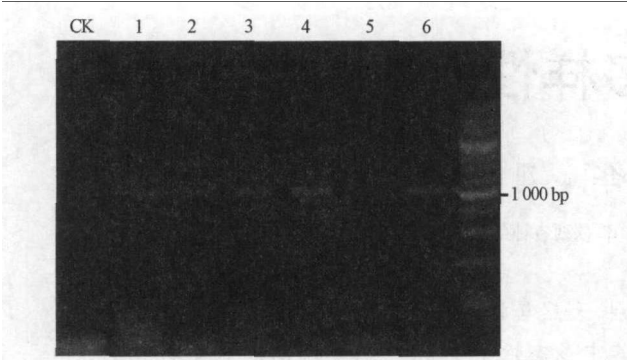


图5 经引物 NTF2/NTR2 PCR 扩增结果 NTF2/NTR2

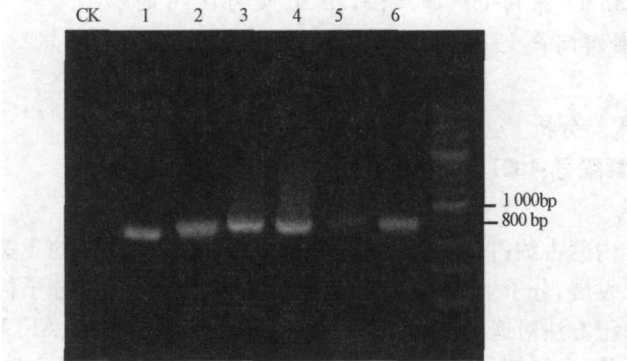


图6 经引物 NTF3/NTR2 PCR 扩增结果 NTF3/NTR2

注:CK:健康植株总 DNA;1:枣疯病植株总 DNA 的 PCR 产物;2:稀释 10 倍枣疯病 DNA 的 PCR 产物;3:稀释 20 倍枣疯病 DNA 的 PCR 产物;4:稀释 30 倍枣疯病 DNA 的 PCR 产物;5:稀释 40 倍枣疯病 DNA 的 PCR 产物;6:稀释 50 倍枣疯病 DNA 的 PCR 产物。

表3 PCR 检测枣树样品的信息

编号	品种	样品数目	症状	组织	PCR		采样地点
					NTF3 /NTR2		
					阳性/个	阴性/个	
1	冬枣	30	无	叶片	0	30	石河子 库尔勒 喀什
2	梨枣	30	无	叶片	0	30	石河子 库尔勒 喀什
3	金丝小枣	30	无	叶片	0	30	石河子 库尔勒
4	灰枣	30	无	叶片	0	30	石河子 库尔勒 喀什
5	喀什圆枣	20	无	叶片	0	28	石河子
6	骏枣	30	无	叶片	1	30	石河子
7	京九三	20	有	叶片	2		库尔勒 喀什
8	鸡心枣	20	无	叶片	0	20	石河子
9	赞枣	20	无	叶片	0	20	石河子 库尔勒
10	脆枣	20	无	叶片	0	20	石河子
			无		2		库尔勒

3 讨论与结论

试验通过对已获得的 16S rDNA 序列进行分析,获得保守序列,根据保守序列设计出 NTF1/NTR1、NTF2/NTR1、NTF3/NTR1、NTF1/NTR2、NTF2/NTR2、NTF3/NTR2 引物对,通过对引物的 PCR 检测体系进行摸索,得到较好的 PCR 检测体系,并且对所获得的序列进行测序,运用 DNAMAN 软件分析其同源性,确定 PCR 扩增出的片段即枣疯病 16S rDNA 序列,并且对各个引物检测的总 DNA 浓度进行分析从而建立比较快速、准确、灵敏的枣疯病检测体系。该文首次在新疆发现枣疯病,具有一定的科研和社会价值,更为广泛的检测新疆各地的枣树患病情况刻不容缓,必须把枣疯病在源头上杜绝,促进枣树产业的健康发展。

参考文献

[1] 温秀军,郭晓军,田国忠,等.几个枣树品种和婆枣单株对枣疯病抗性的鉴定[J].林业科学,2005(3):88-96.

[2] 蔡红,孔宝华,陈海如.长春花黄化植原体(PY)株系的检测与鉴定[J].微生物学报,2003(1):116-119.

[3] 李永,田国忠,朴春根,等.我国几种植物植原体的快速分子鉴别与鉴定的研究[J].植物病理学报,2005(4):293-299.

[4] 朱天生,潘一展,崔廷涛,等.榆树黄化病植原体的分子检测与鉴定[J].植物病理学报,2008(4):401-406.

[5] 樊新萍,田建保,Bertaccini A,等.运用 RAPD 技术分析检测枣疯病植原体基因[J].华北农学报,2007(5):172-175.

[6] 蔡红,张华明,吴华英,等.一种引起香石竹黄化病植原体的初步鉴定[J].植物病理学报,2005(S1):151-152.

[7] 安凤秋,吴云锋,顾沛雯,等.巢式 PCR(Nested-PCR)在植原体检测中的应用[J].陕西农业科学,2008(3):50-52.

[8] 马兵钢,牛建新,马连营,等.库尔勒香梨基因组 DNA 提取及 RAPD 体系建立[J].新疆农业科学,2001(1):18-22.

[9] Lee I M,Hammond R W,Davis R E,et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16 S rRNA for classification and identification of mycoplasma-like. 1993,83:834-842.

[10] Seemuller E,Schneider B,Maurer R. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S rDNA[J]. Int. J. Syst. Bacteriol.,1994,44:440-446.

[11] 牛建新,吕建强,王林,等.核桃早实性相关性状的 SCAR 标记[J].果树学报,2008(5):732-735.

[12] 杨长红,牛建新,叶春秀,等.基于 PCR-RFLP 梨品种 cpDNA 遗传多态性的分析[J].石河子大学学报(自然科学版),2010(2):162-166.

[13] 秦国夫,沈瑞祥. PCR 检测树木菌原体的研究[J].森林病虫害通讯,1995(2):18-19.

[14] 王海妮,吴云锋,安凤秋,等.枣疯病和酸枣丛枝病植原体 16 S rDNA 和 tuf 基因的序列同源性分析[J].中国农业科学,2007(10):2200-2205.

[15] 葛泉卿.不同引物对植原体的检测灵敏度比较研究[J].植物检疫,2003(3):133-136.

[16] 罗大全,陈慕容,叶沙冰,等.多聚酶链式反应检测海南槟榔黄化病[J].热带农业科学,2002(6):13-15.

# 十二个油松种群遗传多样性的 RAPD 分析

赵 飞<sup>1</sup>, 樊军锋<sup>1</sup>, 杨培华<sup>1</sup>, 刘永红<sup>1</sup>, 徐 华<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省种苗工作站, 陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**运用 RAPD 分子标记技术, 对 12 个油松天然居群中 192 个单株进行遗传多样性分析。用筛选出的 20 条引物共扩增出 289 个条带, 其中多态性条带 220 个, 多态性条带百分率为 76.12%。用 NTSYS-PC 软件计算遗传相似性系数进行聚类分析。结果表明: 192 份油松材料间的 SC 值变化范围为 0.598 6~0.965 4, 平均为 0.737 9。采用 UPGMA 法, 在 SC 值为 0.76 的水平上可将供试材料聚为 3 类。表明我国油松天然种群间产生一定程度的变异, 在分子水平上呈现出遗传多态性。

**关键词:**油松; RAPD; 遗传多样性; 遗传距离; 聚类分析

**中图分类号:**S 791.254 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)11-0112-05

油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.) 为松科松属常绿乔木。作为我国北方最主要的针叶树种, 油松喜光, 树干挺拔, 根系发达, 适应性强, 材质好, 耐干旱、抗风、抗瘠薄, 有良好的美化环境和保持水土的功能, 生态功能强大, 在木材产业与松脂、医药产业有巨大的利用价值。油松天然林分布极为广阔, 跨越我国北方大部分省(区)<sup>[1]</sup>, 生态分布区达 300 万 km<sup>2</sup>, 是我国特有的树种。我国天然油松林分布面积最大的省份是陕西, 占全国分布区总面积的 44.28%, 山西占 25.91%, 甘肃占 5.13%,

内蒙古约占 2%<sup>[2]</sup>。近 30~40 a 来, 随着生物学的飞速发展, 分子生物学得到广泛的应用, 可以用多种分子标记方法对遗传多样性检测, 如: RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等, 发展较早又最常用的是 RAPD 标记技术<sup>[3]</sup>。目前, 国内外有不少应用 RAPD 标记进行遗传多样性研究的报道, 在松属植物中, 应用 RAPD 技术的研究包括黄山松、红松、落叶松、马尾松等, 而应用 RAPD 技术对油松进行遗传多样性的研究并不多。

该试验应用 RAPD 技术, 对我国油松主要分布区(陕西、内蒙古、甘肃、山西)的油松种质资源遗传多样性从分子水平上做分析探讨, 为后续的种质改良与种质资源保存工作提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

选择陕西、内蒙古、甘肃、山西四省油松天然林作为试验材料, 选取 12 个能够代表当地油松种质特异性的

**第一作者简介:**赵飞(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为林木遗传育种林业生物技术。E-mail: kitty-chao@163.com。

**责任作者:**樊军锋(1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为林木遗传育种。

**基金项目:**国家林业公益性科研资助项目(200704039); 西北农林科技大学唐仲英育种基金专项资助项目(2009-78)。

**收稿日期:**2011-03-25

## Study the Rapid PCR Detection System of Jujube Phytoplasma

GAO Jing-tao, NIU Jian-xin, WANG Xue-lian, LIU Na, YE Chun-xiu, ZHANG Fei

(Department of Horticulture, Agricultural College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

**Abstract:** In this paper, five pairs primers (NTF1/NTR1, NTF2/NTR1, NTF3/NTR1, NTF1/NTR2, NTF2/NTR2, NTF3/NTR2) were designed according to the 16 S rDNA conservative sequence, in previous studies it was obtained and analyzed. Through compared and set the different temperature and other conditions of PCR system, the optimum reaction conditions of this PCR detection system was found, and used this method to detect some materials of Xinjiang province, and there were phytoplasma in individual samples of Grey dates. Therefore, this system used in detecting phytoplasma of jujube was feasible, and could provide some formation for relevant study in theory.

**Key words:** jujube infected; phytoplasma; detect