

苯酚对枣疯病病原检测及 AFLP 分析的影响

杨海旭¹, 赵 锦², 武晓波², 刘孟军¹, 郑永国²

(¹河北农业大学中国枣研究中心, 保定 071001; ²河北农业大学生命科学学院, 保定 071000)

摘要:苯酚是进行高质量植物 DNA 提取常用的试剂, 但苯酚对患病材料中病原检测及后续分子生物学试验的影响尚未见报道。本试验利用苯酚对健康和患枣疯病的枣树叶片中 DNA 进行提取, 并进行了后续的病原检测和 AFLP 分析, 结果表明 (1) 苯酚抽提获得的 DNA 质量及产率明显高于对照; (2) 苯酚抽提处理对枣疯病病原的检测有直接影响, 当病原含量较低时, 加苯酚抽提后的 DNA 检测不到病原; (3) 苯酚抽提处理与否获得的 DNA 对后续 AFLP 分析的扩增效果没有明显影响; 但两者出现了有规律的差异条带, 经分析此差异应该是由材料中有无病原引起的。本试验结果为寄主材料中病原检测及寄主与病原之间的互作等研究提供了有益参考。

关键词: DNA 提取; 枣疯病; 植原体; 检测; 苯酚; AFLP

Effect of Phenol on Pathogen Detection of Jujube Witches' Broom and AFLP Analysis

YANG Hai-xu¹, ZHAO Jin², WU Xiao-bo², LIU Meng-jun¹, ZHENG Yong-pu²

(¹ Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

² College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000)

Abstract: Phenol is applied to plant DNA extraction commonly, but there was still no report about if phenol had influenced to pathogen detection and further molecular analysis. The healthy and diseased leaves infected by Jujube Witches' Broom (JWB) of Chinese jujube were used to extract total DNA and then to detect pathogen and carry out AFLP analysis. The results showed that (1) The quality and extraction rate of DNA obtained by using phenol was higher than CK; (2) Phenol had a directly influenced the detection of phytoplasma. The phytoplasma couldn't be detected in the leaves with lower amount of pathogen and treated by phenol; (3) Phenol had no influence to the amplified effects of AFLP. But there were obvious different bands between using phenol and without using phenol. It was considered that those different bands were caused by phytoplasma. Those results provided beneficial reference to the study of pathogen detection in host and the relation between pathogen and host.

Key words: DNA Extraction; Jujube Witches' Broom; Phytoplasma; Detection; Phenol; AFLP

植物 DNA 的提取和纯化是植物基因工程研究的基础操作, 而苯酚是进行植物 DNA 提取常用的试剂。枣疯病 (Jujube Witches' Broom, JWB) 病原—植原体 (Phytoplasma) 属于 Bergey's 系统细菌学手册的柔膜菌纲^[1], 严格寄生于植物的韧皮部, 因仍不能进行人工培养, 所以对其遗传本质、生化特性、营

养要求的研究都比较缺乏, 导致其检测和鉴定技术的发展也受到阻碍^[2]。但是病原能否被精确检测直接关系到不同品种抗病性的评价和优良种质的保存水平, 同时植原体检测在枣疯病抗病品种选育与鉴定以及引种、脱毒苗的鉴定中具有重要的实践意义。目前普遍将基因组分析作为研究此有机体的首

收稿日期: 2009-11-17 修回日期: 2010-04-07

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2009000534, 08D020, C2005000267)

作者简介: 杨海旭, 在读硕士, 研究方向为干果种质资源与分子辅助育种。E-mail: haixu_y@126.com.cn

通讯作者: 刘孟军, 教授, 主要从事干果种质资源研究。E-mail: kjliu@hebau.edu.cn

赵锦, 教授, 主要从事枣树抗病资源选育研究。E-mail: zhaojind@hebau.edu.cn

选方法^[3],这就要求在提取和纯化植物体总 DNA 时尽量选用对植原体 DNA 破坏少的方法,同时尽可能提高试验用 DNA 的保真度,以确保总 DNA 的质量。本试验在前期试验中发现苯酚的应用可能对枣疯病病原 DNA 的检测有一定影响,为此本文主要针对 DNA 抽提过程中应用苯酚处理是否会对枣叶片 DNA 的提取、枣疯病病原检测及进一步 AFLP 分析(amplified fragment length polymorphism)产生的影响进行探讨,旨在为进一步开展寄主材料中病原鉴定及寄主与病原之间的互作等分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采样品种为赞皇大枣的健树和枣疯病病树,采样地点为河北省赞皇县许亭村,取样部位为幼嫩叶片,材料采下后立即放入冰盒带回实验室, -20℃ 冻存待用。

1.2 DNA 提取

1.2.1 叶片总 DNA 提取与纯化 DNA 的提取具体步骤:取 0.1g 左右材料叶片,加适量液氮研磨后,加 600μl 提取液(2.0% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 0.5% PVP-40, 0.5mol/L Tris-HCl pH8.0, 0.25mol/L EDTA, 2% 巯基乙醇)混匀于 65℃ 水浴 30min。

抽提过程中添加 Tris-苯酚:(1)在水浴好的材料中加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 4℃, 10000rpm, 离心 10min。取上清再加等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 4℃, 10000rpm, 离心 10min, 抽提 2 次。取上清加入 -20℃ 预冷 0.6 × 异丙醇沉淀, 沉淀用 70% 乙醇和无水乙醇各洗一次, 风干后溶于灭菌双蒸水(ddH₂O)。(2)将以上得到的 DNA 各加 1.5μl Rnase, 用 ddH₂O 补足至 500μl, 37℃ 水浴 30min。在水浴好的材料中加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 4℃, 10000rpm, 离心 10min。取上清再加等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 4℃, 10000rpm, 离心 10min。取上清加入 -20℃ 预冷 0.6 × 异丙醇沉淀, 沉淀用无水乙醇洗一次风干后溶于 ddH₂O。

抽提过程中不添加 Tris-苯酚:(1)在水浴好的材料中加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 4℃, 10000rpm, 离心 10min, 抽提 3 次。取上清加入 -20℃ 预冷 0.6 × 异丙醇沉淀 1h 以上, 沉淀用 70% 乙醇和无水乙醇各洗一次风干后溶于 ddH₂O, 得到 DNA。(2)将以上得到的 DNA 各加 1.5μl Rnase,

用 ddH₂O 补足至 500μl, 37℃ 水浴 30min。在水浴好的材料中加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 4℃, 10000rpm, 离心 10min, 抽提两次。取上清加入 -20℃ 预冷 0.6 × 异丙醇沉淀, 沉淀用无水乙醇洗一次风干后溶于 ddH₂O。

1.2.2 DNA 纯度测定及质量浓度计算 DNA 纯度及浓度测定采用紫外分光光度法。DNA 浓度(μg/mL) = A₂₆₀ × 50 × 稀释倍数, DNA 提取率(μg/g) = DNA 浓度 × 体积/取材量(g)。

1.3 病原检测

1.3.1 直接 PCR 检测 分别以未纯化 DNA 产物和纯化 DNA 产物为模板, 使用根据植原体 16S-23S rDNA 序列设计的通用引物对^[4] P1: 5'-AAGAGTTT-GATCCTGGCTCAGGATT-3', P7: 5'-CGTCCTTCATCG GCTCTT-3' 进行 PCR 扩增^[3]。反应体系: 10 × PCR 缓冲液 3μl, MgCl₂ 2μl, 10mmol/L dNTP 0.4μl, 10 μmol/L 引物各 1μl, 5 U/μl Taq 酶 0.3μl, 模板 DNA 1μl, 加 ddH₂O 使体积至 30μl。反应循环为: 94℃ 预热 6min, 94℃ 50s, 58℃ 1min40s, 72℃ 2min30s, 共 32 个循环, 最后于 72℃ 保温 7min。

1.3.2 巢式 PCR 检测 以直接检测产物为模板, 以巢式引物对 Rm16F2: 5'-CATGCAAGTCGAACGG A-3', Rm16R1: 5'-CTTAACCCCAATCATC-3' 进行 PCR 扩增^[3]。反应体系: 10 × PCR 缓冲液 2μl, MgCl₂ 1.5μl, 10mmol/L dNTP 0.4μl, 10 μmol/L 引物各 1μl, 5 U/μl Taq 酶 0.2μl, 模板产物 1μl, 加灭菌双蒸水使体积至 20μl。反应循环为: 94℃ 预热 2min, 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 2min, 共 30 个循环, 最后于 72℃ 保温 5min。

1.4 AFLP 分析

本试验 AFLP 分析主要采用本实验室建立的方法进行^[5]。

1.4.1 DNA 的酶切、连接、预扩增 DNA 经过限制性内切酶 EcoR I/Mse I 进行双酶切后, DNA 被切成大量含有粘性末端的片段, 然后用与 EcoR I 和 Mse I 酶切位点互补的接头进行连接反应, 接头是已知序列的 20bp 左右的寡核苷酸。用人工合成不带有选择性碱基的 EcoR I + 0 和 Mse I + 0 预扩增引物进行预扩增^[6]。

1.4.2 选择性扩增 对预扩增产物稀释倍数进行了摸索, 最终确定稀释 100 倍进行选择性的扩增。选取差异表达效果好的 16 对 E + NNN 和 M + NNN 组合的选择性引物进行扩增。

2 结果与分析

2.1 苯酚抽提对 DNA 提取效果的影响

苯酚抽提是获得高质量 DNA 普遍采用的步骤, 为了进一步验证苯酚抽提与否对枣叶片 DNA 提取效果的影响, 本试验对不同处理获得的 DNA 进行了电泳检测及 DNA 浓度测定。苯酚抽提与否获得的 DNA 电泳结果见图 1。由图 1 可以看出, 无论纯化前后, 苯酚抽提和未加苯酚获得的 DNA 均没有显著区别, 只是纯化前 RNA 污染较严重; 而纯化后 RNA 去除比较彻底。

提取样品的紫外分光光度计的检测结果见表 1

表 1 未经纯化的 DNA 浓度与提取率

Table 1 Crude extract DNA concentration and extraction rate

	1	2	3	4	5	6	7	8
A_{260}	0.118	0.162	0.151	0.088	0.224	0.223	0.276	0.229
A_{280}	0.054	0.067	0.068	0.033	0.09	0.075	0.087	0.069
A_{260}/A_{280}	2.190	2.420	2.220	2.670	2.490	2.970	3.170	3.320
DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	885.0	1215.0	1132.5	660.0	1680.0	1672.5	2070.0	1717.5
DNA 提取率 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	295.0	405.00	377.5	220.0	560.0	557.5	690.0	572.5

1、3、5、7: 加酚处理 Using phenol; 2、4、6、8: 不加酚处理 Without using phenol, 下同 The same as below

表 2 纯化后 DNA 浓度与提取率

Table 2 Purification DNA concentration and extraction rate

	1	2	3	4	5	6	7	8
A_{260}	0.323	0.360	0.235	0.553	0.305	0.310	0.454	0.565
A_{280}	0.174	0.185	0.126	0.292	0.165	0.171	0.255	0.287
A_{260}/A_{280}	1.856	1.946	1.865	1.894	1.848	1.813	1.780	1.969
DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	807.5	900.0	587.5	1382.5	762.5	775.0	1135.0	1412.5
DNA 提取率 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	121.125	135.0	88.1	207.4	114.4	116.2	170.3	211.9

2.2 苯酚对枣疯病病原检测的影响

本试验对赞皇大枣枣疯病病叶及表现健康叶片提取获得的 DNA 进行了枣疯病病原检测, 检测结果见图 2。

由图 2-a、图 2-b 可见, 利用 P1/P7 引物进行直接检测, 在纯化前、后 DNA 中枣疯病病叶和健叶植原体特异条带 (1.8 Kb) 有规律的出现, 纯化前表现枣疯病的病叶中都扩增出清晰的植原体特异条带, 而表现健康的均没有此条带, 此结果与田间的症状表现一致; 纯化后表现健康的样品均没有扩增出植原体特异条带, 同时也有 1 个表现枣疯病的病叶且加苯酚抽提的材料中未扩增出该特异条带。

和表 2。由表 1、表 2 结果可知, 在 DNA 纯化前后, 用苯酚抽提后获得的 DNA 质量几乎都高于不加苯酚抽提的 DNA, 而且经苯酚抽提所得的 DNA 浓度和产率几乎都低于不加苯酚抽提的材料。

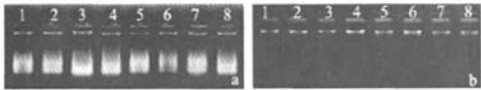


图 1 苯酚对赞皇大枣叶片 DNA 提取效果影响

Fig. 1 The effect of phenol to DNA extraction from the leaves of 'Zanhuangdazao'

a: 未纯化 DNA Partially crude DNA; b: 纯化 DNA Partially purified DNA
1、3、5、7: 加苯酚处理 Using phenol; 2、4、6、8: 不加苯酚处理 Without using phenol

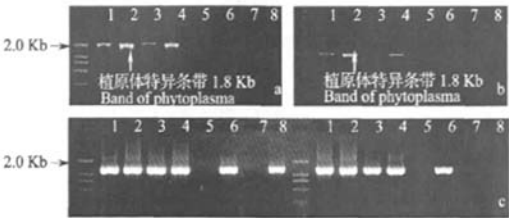


图 2 苯酚与未用苯酚处理获得的 DNA 样品进行枣疯病病原检测结果

Fig. 2 The pathogen detection of different DNA between using phenol and without using phenol

a: 未纯化 DNA 直接检测 Direct PCR detection of crude DNA; b: 纯化 DNA 直接检测 Direct PCR detection of purified DNA; c: 未纯化 (左) 及纯化 DNA (右) 巢式检测 Crude extracts (left) and purification of DNA (right) detected by nested PCR 1、2、3、4: 赞皇大枣表现枣疯病的病叶 The diseased leaves of 'Zanhuangdazao'; 5、6、7、8: 赞皇大枣表现健康的健叶 The behaved healthy leaves of 'Zanhuangdazao'

由图 2-c 可见,利用 Rm16F2/Rm16R1 引物进行巢式 PCR 检测,发现纯化前后的 DNA 表现枣疯病的病叶材料中无论用苯酚抽提与否均扩增出特别亮的植原体特异条带(1.4Kb),而表现健康的材料中用苯酚抽提的样品均未扩增出植原体特异条带,但未用苯酚抽提的对照材料却扩增出了特别亮的植原体特异条带。

本试验中所用样品为表现健康和表现枣疯病症状的材料,由直接和巢式 PCR 的病原检测结果比较可看出,表现健康的材料在直接 PCR 没有检测出病原,但在巢式 PCR 中却明显检测出了病原,说明外观表现健康的材料也有可能已经感染病原,但由于病原含量极低,所以在外观上并未表现症状,而巢式 PCR 可进行病原含量的精确检测。

但在表现健康的材料中,苯酚处理与未加苯酚的对照中均是苯酚处理后不能检测出病原,而未加苯酚的对照中检测出了明显的病原特异条带。在直接 PCR 中也有 1 个表现枣疯病但用苯酚抽提的材料中未扩增出该特异条带。综合来看,在 DNA 提取过程中加苯酚处理对枣疯病病原检测有显著影响,说明枣疯病病原—植原体的 DNA 在加苯酚抽提过程中有可能被去除一部分,当病原含量较低时有可能完全被去除,导致在后续的直接和巢式检测中不能被检测到。

2.3 苯酚对 AFLP 分析的影响

为了确定苯酚抽提处理与否获得的 DNA 对进行后续分子生物学试验的影响,本试验对不同处理获得的 DNA 进行了 AFLP 分析,结果见图 3、图 4。

由图 3 和图 4 可以看出,从扩增效果看,不管是加苯酚处理还是未加苯酚处理获得的 DNA 均可以扩增得到理想的扩增效果,扩增图谱中条带整齐、清晰。虽然未纯化 DNA 和纯化 DNA 在应用一些引物扩增时个别条带出现强弱差异,即未纯化 DNA 扩增获得的个别条带弱一些,但条带信息没有缺失现象。此结果一方面说明未纯化 DNA 中虽有 RNA 污染,但对 AFLP 扩增的影响不大;另一方面也说明本试验应用的 AFLP 技术体系比较稳定。

但通过对 AFLP 图谱进行进一步的条带分析,发现 AFLP 扩增中出现了一些差异条带,如图 3、图 4 中箭头所示。这些差异条带均是在表现健康而且在提取过程中添加 Tris-苯酚的材料中出现;同时,这些材料也是经巢式 PCR 未扩得病原的材料。因

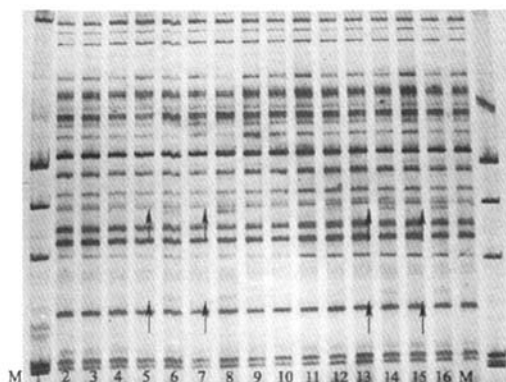


图 3 不同处理获得的 DNA 进行 AFLP 分析结果 (Eata/Mcat)

Fig. 3 AFLP patterns of DNA obtained by different treatment (Eata/Mcat)

1~8:未纯化 DNA 扩增结果 The amplified results of crude DNA; 9~16:纯化 DNA 扩增结果 The amplified results of purified DNA; 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12:赞皇大枣表现枣疯病的病叶 The diseased leaves of 'Zanhuangdazao'; 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16:赞皇大枣表现健康的健叶 The behaved healthy leaves of 'Zanhuangdazao'; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15:加苯酚处理 Using phenol; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16:不加苯酚处理 Without using phenol

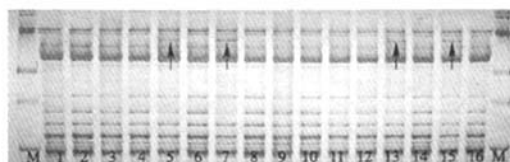


图 4 不同处理获得的 AFLP 图谱 (Eatt/Mcat)

Fig. 4 AFLP patterns of different treatment (Eatt/Mcat)
样品顺序同图 3 The order of samples was same as fig. 3

为在患病材料中添加 Tris-苯酚处理和对照之间没有出现这些差异条带,可以排除是苯酚处理造成的这些差异条带。因此,本试验认为 AFLP 分析所得差异条带应该是因为材料中有无枣疯病病原所引起的。

3 讨论

以往的试验报道 DNA 提取方法很多^[7-10],大都是进行 CTAB 法与 SDS 法的比较或对 CTAB 法进行改良^[11-17],但抽提过程中是否使用 Tris-苯酚、Tris-苯酚对 DNA 提取及后续试验有无影响并无定论。目前,有关苯酚、对苯二酚等酚类化合物对 DNA 的损伤主要集中于哺乳动物体内代谢水平的研究。外源苯酚对体外 DNA 如何作用及相关影响尚未见报道。本试验过程中发现,在相同条件下提取 DNA 加入苯酚抽提对 DNA 有一定影响。同时加酚抽提后 DNA 褐

化较为严重,可能是因为苯酚在最后的 DNA 中还会有所残留并被氧化所致。对 DNA 质量和浓度的测定结果说明,经苯酚抽提的 DNA 质量和浓度均较高,可见苯酚对多糖和蛋白类杂质的去除效果明显。但从后续 AFLP 扩增效果看,不管 DNA 提取过程中是否应用苯酚处理均可以获得理想的扩增结果,这和以往报道 AFLP 分析要求 DNA 纯度和质量较高有所不同。

以往报道中检测植原体所需总 DNA 提取方法主要针对各自不同的寄主材料,且都未明确苯酚抽提是否对植原体 DNA 有影响^[18-23],但本试验发现表型健康的赞皇大枣叶片材料中,用苯酚抽提纯化后的 DNA 经巢式 PCR 检测未能检测到病原,而不用苯酚抽提的 DNA 巢式 PCR 检测均能检测到病原。这说明虽然对照健康材料外观表现健康,但实际上体内已经感染了枣疯病病原,只不过病原浓度较低尚不能表现症状^[24]。由于病原含量少,提取的总 DNA 中病原 DNA 也相应减少,使用苯酚抽提后有可能在一定程度上破坏基因组 DNA,尤其对含量较少的植原体基因组破坏更加明显,使最终检测不到病原特异条带。因此建议,为了得到较纯的植物基因组 DNA 可以在抽提过程中加入苯酚,而为了检测病原在提取总 DNA 时抽提过程中尽可能不要加苯酚。这样就可以精确鉴定样本中有无病原,并依据此结果对抗病种质做出更加全面的评价。同时在进行种质资源的保存时,可以依据病原的精确检测结果来进行优质资源筛选。

本试验中的差异条带均出现在表现健康且应用苯酚抽提所得的 DNA 材料中,而这些材料又正是经巢式 PCR 检测后未能检测到病原的样品,因此推测所得差异来自有无病原。但枣疯病病原是如何影响枣基因组 DNA 和后续 AFLP 分析的尚需进行深入研究。

参考文献

[1] 赖帆,李永,徐启聪,等.植原体的最新分类研究动态[J].微

生物学通报,2008,35(2):291-295

- [2] 安凤秋,吴云锋,孙秀芹,等.小麦蓝矮病植原体延伸因子(EF-Tu) tuf 基因序列的同源性分析[J].中国农业科学,2006,39(1):74-80
- [3] 刘清神,许东林,林盘芳,等.广州桑树植原体分子检测及多样性初探[J].蚕业科学,2006,32(1):1-5
- [4] Smart C D, Schneider B, Blomouist C L, et al. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16-23S rRNA spacer region[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 2988-2993
- [5] 乔勇,赵锦,杨海旭,等.21个枣品种(系)的 AFLP 指纹分析[J].植物遗传资源学报,2009,10(2):205-210
- [6] 薛渝峰.植原体诱导下抗枣疯病相关基因的差异表达研究[D].河北农业大学,2008:11-13
- [7] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998:597-614
- [8] Aljanabi S M, Martinez I, et al. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4692-4693
- [9] Kaufman B, Richards S, Dierig D A. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species[J]. Industrial Crops and Products, 1999, 9: 111-114
- [10] Lefort F, Douglas C C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus* [J]. Ann For Sci, 1999, 56: 259-263
- [11] 陈昆松,李方,徐昌杰,等.改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J].遗传,2004,26(4):529-531
- [12] 李莉,彭建营,白瑞霞.不同方法对枣叶片总 DNA 提取效果的影响[J].果树学报,2007,24(3):389-392
- [13] 曾强成,郑世英,沈亮.金丝小枣基因组 DNA 的优化提取方法[J].生物技术通讯,2004,15(2):152-153
- [14] 李瑞环,李新岗,黄建,等.枣树基因组 DNA 提取及其 RAPD 体系优化[J].安徽农业科学,2007,35(17):5102-5104
- [15] 文亚峰,何钢.枣叶片 DNA 的提取以及 AFLP 反应体系的建立[J].中南林业科技大学学报,2007,27(3):25-28
- [16] 黄永莲,刘媛,黄真池.植物总 DNA 的提取方法的改进[J].湛江师范学院学报,2007,28(3):104-105
- [17] 马兵钢,赵宗胜,冯建荣,等.梨属 DNA 提纯方法的比较研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2000,4(4):277-281
- [18] 安凤秋,吴云锋,顾沛雯.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
- [19] 漆艳香,谢世贤,张辉强,等.植原体 DNA 提取方法的改良[J].生物技术通报,2004(4):44-46
- [20] 高瑞,李向东,王洁,等.绣线菊丛枝病病原的分子鉴定[J].林业科学,2007,43(11):72-75
- [21] 邓晓东,费小雯,刘志昕,等.橡胶丛枝病分子检测研究[J].热带作物学报,2001,22(2):8-12
- [22] 李微虹,邱井生,李镭,等.香蕉束顶病植原体 16S rDNA 片段的 RFLP 和序列分析[J].微生物学报,1999,39(4):315-320
- [23] 王海妮,吴云锋,安凤秋,等.枣疯病和酸枣丛枝病植原体 16S rDNA 和 tuf 基因的序列同源性分析[J].中国农业科学,2007,40(10):2200-2205
- [24] 刘孟军,赵锦,周俊义.枣疯病情分级体系研究[J].河北农业大学学报,2006,29(1):31-33

《中国烟草学报》是中国烟草学会主办的覆盖烟草工业、农业、经济管理及相关领域的学术期刊。中国科技核心期刊,中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,双月刊(ISSN 1004-5708, CN 11-2985/TS),16开本,逢双月末出版,88页,国内公开发行,每册定价10元人民币,全年6册共60元。邮发代号为80-504,全国各邮局均可订阅。

地址:(100045)北京月坛南街55号《中国烟草学报》编辑部

电话:010-63605768,63606237

E-mail: xh-bj@ tobacco. gov. cn

《湖南农业科学》是由湖南省农科院、湖南省科技厅星火促进会和湖南农业大学联合主办的综合性农业技术类期刊。半月刊,16开本,上半月学术刊160页,下半月推广刊60页,封面铜版纸,内芯轻涂纸,印刷精美,内容丰富。单期定价8.00元,全年192.00元。邮发代号42-20。

地址:(410125)长沙市芙蓉区远大二路892号湖南省农科院情报所

《湖南农业科学》杂志社

电话:0731-84691322/84693060

E-mail: hnnykx@ vip. 163. com

作者: [杨海旭](#), [赵锦](#), [武晓波](#), [刘孟军](#), [郑永圃](#), [YANG Hai-xu](#), [ZHAO Jin](#), [WU Xiao-bo](#), [LIU Meng-jun](#), [ZHENG Yong-pu](#)

作者单位: [杨海旭, 刘孟军, YANG Hai-xu, LIU Meng-jun \(河北农业大学中国枣研究中心, 保定, 071001\)](#), [赵锦, 武晓波, 郑永圃, ZHAO Jin, WU Xiao-bo, ZHENG Yong-pu \(河北农业大学生命科学学院, 保定, 071000\)](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11 (5)

参考文献 (24条)

1. [安凤秋; 吴云锋; 孙秀芹](#) [小麦蓝矮病植原体延伸因子\(EF-Tu\) tuf基因序列的同源性分析](#) [期刊论文] - [中国农业科学](#) 2006 (01)
2. [刘清神; 许东林; 林盘芳](#) [广州桑树植原体分子检测及多样性初探](#) [期刊论文] - [蚕业科学](#) 2006 (01)
3. [刘孟军; 赵锦; 周俊义](#) [枣疯病病情分级体系研究](#) [期刊论文] - [河北农业大学学报](#) 2006 (01)
4. [陈昆松; 李方; 徐昌杰](#) [改良CTAB法用于多年生植物组织基因组DNA的大量提取](#) [期刊论文] - [遗传](#) 2004 (04)
5. [Lefort F; Douglas G C](#) [An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species Acer, Fraxinus, Pronus and Quercus](#) [外文期刊] 1999
6. [Kaufman B; Richards S; Dierig D A](#) [DNA isolation method for high polysaccharide Lesquerella species](#) [外文期刊] 1999 (2)
7. [Aljanabi S M; Martinez I](#) [Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques](#) [外文期刊] 1997 (22)
8. [王关林; 方宏筠](#) [植物基因工程原理与技术](#) 1998
9. [薛渝峰](#) [植原体诱导下抗枣疯病相关基因的差异表达研究](#) 2008
10. [乔勇; 赵锦; 杨海旭](#) [21个枣品种\(系\)的AFLP指纹分析](#) [期刊论文] - [植物遗传资源学报](#) 2009 (02)
11. [Smart C D; Schneider B; Blomouist C L](#) [Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16-23S rRNA spacer region](#) 1996
12. [王海妮; 吴云锋; 安凤秋](#) [枣疯病和酸枣丛枝病植原体16S rDNA和tuf基因的序列同源性分析](#) [期刊论文] - [中国农业科学](#) 2007 (10)
13. [李横虹; 邱并生; 李锂](#) [香蕉束顶病植原体16S rDNA片段的RFLP和序列分析](#) 1999 (04)
14. [邓晓东; 费小雯; 刘志昕](#) [橡胶丛枝病分子检测研究](#) [期刊论文] - [热带作物学报](#) 2001 (02)
15. [高瑞; 李向东; 王洁](#) [绣线菊丛枝病病原的分子鉴定](#) [期刊论文] - [林业科学](#) 2007 (11)
16. [漆艳香; 谢艺贤; 张辉强](#) [植原体DNA提取方法的改良](#) [期刊论文] - [生物技术通报](#) 2004 (04)
17. [安凤秋; 吴云锋; 顾沛雯](#) [巢式PCR\(Nested-PCR\)在植原体检测中的应用](#) [期刊论文] - [陕西农业科学](#) 2008 (03)
18. [马兵钢; 赵宗胜; 冯建荣](#) [梨属DNA提纯方法的比较研究](#) [期刊论文] - [石河子大学学报\(自然科学版\)](#) 2000 (04)
19. [黄永莲; 刘媛; 黄真池](#) [植物总DNA的提取方法的改进](#) [期刊论文] - [湛江师范学院学报](#) 2007 (03)
20. [文亚峰; 何钢](#) [枣叶片DNA的提取以及AFLP反应体系的建立](#) [期刊论文] - [中南林业科技大学学报](#) 2007 (03)
21. [李瑞环; 李新岗; 黄建](#) [枣树基因组DNA提取及其RAPD体系优化](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2007 (17)
22. [曾强成; 郑世英; 沈亮](#) [金丝小枣基因组DNA的优化提取方法](#) [期刊论文] - [生物技术通讯](#) 2004 (02)
23. [李莉; 彭建营; 白瑞霞](#) [不同方法对枣叶片总DNA提取效果的影响](#) [期刊论文] - [果树学报](#) 2007 (03)
24. [赖帆; 李永; 徐启聪](#) [植原体的最新分类研究动态](#) [期刊论文] - [微生物学通报](#) 2008 (02)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201005023.aspx