



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4874—2017

葡萄金黄化植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of Grapevine flavescence dorée phytoplasma

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国二连浩特出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王有福、李鑫、张永宏、曹冬梅、姜一、胡强、刘卉秋、王秀芬、徐凤敏。

葡萄金黄化植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了葡萄金黄化植原体的检疫和鉴定方法。
本标准适用于进境葡萄及其繁殖材料中葡萄金黄化植原体的检疫和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。
SN/T 1157 进出境植物苗木检疫规程

3 葡萄金黄化植原体基本信息

中文名:葡萄金黄化植原体
英文名:Grapevine flavescence dorée phytoplasma
分类地位:软壁菌门(Tenericutes),柔膜菌纲(Mollicutes),非固醇菌原体目(Acholeplasmatales),非固醇菌原体科(Acholeplasmataceae),植原体属(*Phytoplasma*),16S rV 植原体组。
葡萄金黄化植原体的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

葡萄金黄化植原体生物学特性和基因特性作为本标准鉴定方法的主要依据。
以组织材料症状观察、DAPI 染色的形态学为初步筛查方法;以植原体核糖体 16S rDNA 序列特征为主要的判定依据。

5 仪器设备和主要试剂

5.1 仪器设备

定性 PCR 仪、超净工作台、高压灭菌锅、台式冷冻离心机、纯水仪、台式小型离心机、冰箱、旋涡振荡器、微量进样器、电泳仪、水浴锅、凝胶成像系统等。

5.2 主要试剂

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂和去离子水。PCR 反应体系用双蒸水。其他试剂比如各种溶液、缓冲液和培养基都是检测方法特有的,都应按附录 B 要求准备。商品化试剂参见其使用说明。

植物 DNA 提取试剂盒、PCR Premix、超纯水、DNA marker 及 DNA 提取试剂等。

核酸提取研磨液(100 mL): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2.17 g; KH_2PO_4 , 0.41 g; 蔗糖, 10 g; BSA (Fraction V), 0.15 g; PVP-10, 2 g。pH7.6 高温灭菌, 4℃保存。

DNA 提取液: Tris-HCl, 100 mmol/L; EDTA, 100 mmol/L; NaCl, 250 mmol/L; 调 pH 至 8.0。

50×TAE: 2.0 mol/L Tris, 1.0 mol/L NaAc, 50 mmol/L EDTA, pH 8.0。

DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶。

6 检测鉴定方法

6.1 症状观察

6.1.1 现场查验

现场对葡萄苗木进行观察, 症状描述参见附录 A, 选取可疑症状(参见附录 A)植株样品和随机样品(具体取样方法见 SN/T 1157)带回实验室检测。

6.1.2 DAPI 染色

选取幼嫩组织(新叶叶梗、枝梢、茎秆及根部韧皮部组织), 切片, 用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 溶液(4', 6-二脒基-2-苯基吡啶)染色, 在 460 nm 激发条件, 荧光显微镜观察, 在韧皮部筛管部位有明显的蓝色荧光信号表明有植原体存在。因植株内植原体分布不均, 故每个样品需选取不同部位的幼嫩材料进行检测。

6.2 DNA 提取

取所选新鲜材料的韧皮部及叶中脉 0.3 g, 或干材料 0.1 g, 取适量液氮研磨, 再加入研磨液 2 mL 充分研磨, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。加入 500 μL DNA 提取液, 20 μL 蛋白酶 K (5 mg/mL), 轻轻混匀, 加入 80 μL 10% 十二烷基硫酸钠, 混匀, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h~2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 6 000 r/min, 10 min, 取上清液。加入 2/3 体积异丙醇到上清液中, 轻混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保持至少 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min, 15 min, 弃上清液。加入 600 μL TE 缓冲液, 30 μL SDS, 12 μL 蛋白酶 K (5 mg/mL), 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min~60 min。加 100 μL 5 mol/L NaCl 混匀, 再加入 84 μL CTAB/NaCl 溶液混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min。加入等体积三氯甲烷: 异戊醇(24:1)混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min, 5 min, 重复直至无中间白色层。上清液加入 2/3 体积异丙醇, 混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保持至少 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min, 10 min, 弃上清液。加入 1 mL 70% 乙醇洗涤, 12 000 r/min 1 min。洗涤 2 次。加入 30 μL TE 混匀溶解。 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存。

注: 也可采用商品试剂盒提取, 但通常上述方法提取的核酸质量更优。

6.3 通用引物 PCR 扩增及序列测定

用 2 对引物进行巢式 PCR 反应及凝胶电泳检测, 方法见附录 B。

6.4 序列分析鉴定

将第二轮 PCR 产物(引物 A4F/A4R, 产物大小为 305 bp)进行序列测定, 在 Genbank 中进行序列比对。

7 结果判定

7.1 形态学鉴定

表现症状与 A.1 描述一致且 6.1.2 检测实验中 DAPI 染色观察结果显示蓝色荧光, 可初步判定为植原体。

7.2 分子生物学鉴定

初步判定为植原体病害的植物材料,经 6.3 和 6.4 步骤后,出现 500 bp 左右特异性条带,且该条带测序结果与 genbank 中葡萄金黄化植原体(*Grapevine flavescence dorée phytoplasma*)的相似度达 99%以上,即判定为葡萄金黄化植原体。

8 样品保存与复核

8.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出葡萄金黄化植原体的样品应保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满 6 个月后须经高压灭菌后方可处理。

8.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳照片,并附 DNA 测序结果。

附录 A

(资料性附录)

葡萄金黄化植原体资料

A.1 表现症状及危害

葡萄金黄化与其他引起葡萄黄化的植原体病害不易区分,症状为叶片褪绿,朝下反卷,花序枯死,浆果凋萎;被侵染的藤条极度下垂,生长严重不良;树势衰退迅速。在“白果”品种上,叶片向阳部分黄化,使叶片表面具金属光泽;枝梢变脆,顶芽和侧芽可能坏死。在感病品种上,病枝茎部树皮会出现纵向裂缝。某些品种在保护下不受再侵染时可以恢复。部分砧木能够抗病。受侵染的植株产量下降,果实酸度提高,含糖下降,严重影响品质。1949年~1954年间,该病害在法国流行,造成巨大损失。

葡萄黄化病是一种典型的流行病,病原菌通过带病繁殖材料和昆虫介体传播,能很快引起病害的扩展。1949年~1954年间,法国的阿马尼亚和卡劳斯地区,所有 Bacc22A 葡萄发病,在意大利北部情况也十分相似。该病害对前南斯拉夫及其邻国也造成严重的威胁。

A.2 寄主范围

目前已知所有的栽培葡萄均不同程度地感病。通过介体可传播至蚕豆(*Vicia faba* Linn)、蒿子(*Artemisia apiacea* Hance)及白三叶草(*Trifolium repens*)上。

A.3 传播途径

该病害的近距离传播主要为介体传播,叶蝉(*Cicadellidae*)能够传播该病害,可以传播 5 km~10 km;远距离传播主要靠苗木的调运。

A.4 地理分布

葡萄金黄化病最早于 1957 年发生于法国西南部,随后意大利和西班牙均有该病害的报道。目前已知分布于法国、意大利、美国、加拿大、西班牙和以色列。近十几年间由于血清学和分子生物学技术的发展,才将不同的葡萄黄化病区分开来,因此下列有葡萄黄化病报道的国家和地区均为可疑地区,包括罗马尼亚、澳大利亚、希腊、瑞士、摩尔达维亚、匈牙利、斯洛文尼亚、克罗地亚、智利和南非。

附 录 B
(规范性附录)
PCR 凝胶电泳检测

B.1 引物序列

见表 B.1

表 B.1 引物序列

反应	引物名称	引物序列 5'-3'	扩增产物长度
第一轮 PCR	R16mF2	CAT GCA AGT CGA ACG GA	1 416 bp 左右
	R16mR1	CTT AAC CCC AAT CAT CGA C	
第一轮 PCR	A4F	GTC TTG TTA TAG AAA CTG TCT TG	305 bp 左右
	A7R	GCG GGA CTT AAC CCA AC	

B.2 PCR 反应体系及参数

B.2.1 PCR 反应体系

见表 B.2

表 B.2 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/μL
10×PCR 缓冲液	2.5
2.5 mmol/L dNTP	2.0
10 μmol/L 上游引物	2.0
10 μmol/L 下游引物	2.0
5U/μL Taq DNA 聚合酶	0.2
10 ng/μL 模板 DNA	2.0
双蒸水	14.3
总体积	25.0

注：DNA 模板的取量应根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节；第一轮与第二轮 PCR 均采用此体系。

B.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照：以健康的叶片 DNA 为模板。
阳性对照：以携带有葡萄金黄化植原体 16S rDNA 序列的质粒或总 DNA 为模板。
PCR 反应的空白对照：以灭菌去离子水代替 DNA 模板。

B.2.3 PCR 的反应条件

用引物 R16mF1/R16mR1 进行第一轮 PCR。反应条件为:95 ℃/8 min;95 ℃/60 s,55 ℃/60 s,72 ℃/90 s,35 个循环;72 ℃/10 min。

第一轮 PCR 产物用灭菌双蒸水 1 : 50(体积比)稀释,取 1 μL 为模板利用通用引物 A4F/A7R 进行第二轮 PCR 反应,反应体系见表 B.2。反应条件同上。

不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

B.3 测序

将上述第二轮 PCR 产物进行序列测定,并与 Genbank 中已知序列进行比对。

B.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 2%的琼脂糖凝胶,进行电泳分析,电泳结束后在凝胶成像仪观察并记录结果。

B.5 结果判断

序列比对后,同源性达 99%以上为阳性结果。
