



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4875—2017

来檬丛枝植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of Lime witches' broom phytoplasma

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

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、中华人民共和国四川出入境检验检疫局。

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

来檬丛枝植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了来檬丛枝植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进境来檬苗木中来檬丛枝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 来檬丛枝植原体基本信息

英文名:Lime witches' broom 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 rII 植原体组。

来檬丛枝植原体的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

来檬丛枝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 用具

移液器、研钵、离心管、PCR 管、量筒、烧杯、酒精灯、镊子等。

5.3 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): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.17 g; KH_2PO_4 , 0.41 g;蔗糖, 10 g;BSA(Fraction V), 0.15 g;PVP-10, 2 g。pH 7.6 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

现场对来檬苗木进行观察, 症状描述参见附录 A, 选取可疑症状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 μg/mL DAPI 溶液染色, 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℃ 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℃ 温育 1 h~2 h, 4℃ 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℃ 保持至少 30 min, 4℃ 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℃ 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℃ 温育 10 min。加入等体积三氯甲烷: 异戊醇(24:1)混匀, 4℃ 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℃ 保持至少 3 min, 4℃ 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℃ 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 R16F2/R2, 产物大小为 1 239 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 1 239 bp 特异性条带,且该条带测序结果与 genbank 中来檬丛枝植原体(Lime witches' broom phytoplasma)的相似度达 99%以上,即可判定为来檬丛枝植原体。

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。对检出来檬丛枝植原体的样品应保存于-20℃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)
来檬丛枝植原体资料

A.1 表现症状及危害

来檬丛枝植原体可感染整株植株,造成小叶、褪绿、小枝干死亡,直至没有正常的叶片和芽存在。感染该病的植株不能产生花和果实,且树木显症后 4 年~5 年死亡。感染来檬丛枝植原体症状见图 A.1。

A.2 寄主范围

来檬丛枝植原体唯一自然寄主是生长在阿拉伯半岛的来檬(*Citrus aurantiifolia*),可通过嫁接感染长春花属(*Catharanthus*)植物、枳橙(*Citrange*)等。

A.3 传播途径

可通过嫁接感染长春花属植物、枳橙等。据报道,菟丝子、叶蝉均可作为该病害的传播介体。

A.4 地理分布

1975 年左右,由来檬丛枝植原体引发的丛枝病在阿曼首次发现,在此之前,并无相似症状描述。从世界范围来看,病菌的突然出现,很可能是由其他地方引进的苗木携带而来。目前该有害生物在印度、伊朗、阿曼、阿联酋、墨西哥均有危害的报道。



注: 引自 <http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=0746032>。

图 A.1 感染来檬丛枝植原体症状

附 录 B
(规范性附录)
PCR 凝胶电泳检测

B.1 引物序列

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	R16mF1	CAT GCA AGT CGA ACG GA	1 416 bp
	R16mR1	CTT AAC CCC AAT CAT CGA	
第二轮 PCR	R16F2	ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG	1 239 bp
	R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	

B.2 PCR 反应体系及参数

B.2.1 PCR 反应体系

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
5 U/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：以携带有来檬丛枝植原体 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 R16F2/R2 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。
