



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3687—2013

桃 X 病植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of peach X phytoplasma

2013-08-30 发布

2014-03-01 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：中华人民共和国湖北出入境检验检疫局、华中农业大学、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：冯汉利、王利平、王振华、洪霓、李金甫、赵晖、曾宪东、王有福。

桃 X 病植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中桃 X 病(Peach X disease)的现场检疫和分子生物学鉴定方法。
本标准适用于进出境桃、油桃、樱桃、李树等种苗中桃 X 病植原体的检疫鉴定。

2 桃 X 病植原体基本信息

英文名:Peach X phytoplasma
分类地位:细菌界(Bacteria),软壁菌门(Tenericutes),柔膜菌纲(Mollicutes)(又称软球菌纲),非固
醇菌原体目(Acholeplasmatales),非固醇菌原体科(Acholeplasmataceae),植原体属(*phytoplasma*),
16SrIII 植原体组。该植原体的地理分布、寄主范围和症状、传播途径及基因组特征等参见附录 A。

3 方法原理

DAPI 染色后的形态学观察为初步筛查方法;以植原体核糖体 16Sr DNA 通用引物进行 PCR 扩增、
测序及限制性内切酶指纹图谱为主要的判定依据。

4 主要仪器设备和用具

4.1 仪器设备

PCR 仪、荧光显微镜、超净工作台、切片机、电泳仪、凝胶成像分析仪、冷冻离心机、电子天平
(1/10 000 g)、超低温冰箱、常规冰箱、灭菌锅、pH 计、水浴锅、振荡器等。

4.2 用具

可调移液器(0 μ L~20 μ L、20 μ L~200 μ L、200 μ L~1 000 μ L)、吸头、研钵、离心管(1.5 mL、
10 mL)、PCR 管(0.2 mL)、量筒、烧杯、镊子等。

5 主要试剂

5.1 CTAB 缓冲液

CTAB	2%
Tris-HCl	100 mmol/L(pH 8.0)
EDTA	20 mmol/L(pH 8.0)
氯化钠(NaCl)	1.4 mol/L
PVP 40	1%

5.2 其他试剂

DAPI 染色液、液氮、 $MgCl_2$ 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物等。

6 检疫鉴定方法

6.1 症状检查

观察桃、樱桃、油桃等种苗、果实、叶片等,症状描述参见附录 A。

6.2 样品的采集及制备

取有疑似症状的植物的不同部位叶、枝等植物部分进行实验室检测鉴定。

6.3 DAPI 染色

选取幼嫩组织(叶脉、侧芽),将叶柄和叶脉固定于 5% 戊二醛缓冲液中,4℃ 保存备用。制作切片,切片经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)冲洗 3 次;用 1 $\mu g/mL$ DAPI 溶液染色 10 min~15 min,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。

6.4 植原体形态观察

对采集的植物样品制备超薄切片,通过透射电镜观察植原体形态方法(见附录 B)。

6.5 植原体通用引物的 Nested-PCR 扩增、凝胶电泳及序列测定

16Sr DNA 的扩增使用巢式 PCR,第一次 PCR 扩增使用通用引物为 P1/P7,第二次 PCR 扩增采用通用引物 R16F2n/R2;基于引物 R16F2n/R2 扩增的 16Sr DNA 基因的 PCR 产物凝胶电泳并经测序。具体操作见附录 C。

6.6 通用引物扩增产物的 RFLP 指纹图谱检测

在 6.5 检测中,若经通用引物 R16F2n/R16R2 扩增所得到的序列通过软件进行 RFLP 图谱分析,具体操作见附录 D。

7 结果判定

7.1 症状表现与 A.3 描述一致且 DAPI 染色观察结果显示蓝色荧光,可初步判定为植原体,但需通过 6.5、6.6 的方案进一步检测。

7.2 在 6.4 检测中,电镜超薄切片在韧皮部筛管细胞中存在大量植原体,可初步判定该植物样品携带植原体,需要通过 6.5、6.6 的方案进一步检测。

7.3 在 6.5 检测中,若通过通用 P1/P7 及 R16F2n/R2 两对引物进行巢式 PCR 扩增,第二次扩增产物经凝胶电泳检测结果为阳性,且 R16F2n/R2 扩增产物测序结果经比对,与 C.4 序列一致,则可判定该样品携带桃 X 病植原体。

7.4 在 6.6 检测中,通用引物 R16F2n/R2 扩增产物的 RFLP 分析片段大小与桃 X 植原体标准图谱(见图 D.1)相符,可判定该样品携带桃 X 病植原体。

8 样品保存

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。对检出桃 X 病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结果照片。

SN/T 3687—2013

附 录 A

(资料性附录)

桃 X 病植原体其他相关信息

A.1 地理分布

北美洲:加拿大(格雷特湖地区)、美国(1931 年在加利福尼亚首次发现,现除了南卡罗来纳州、乔治亚州、阿肯色州和德克萨斯州外,几乎传遍整个美国),中国尚无报道。

A.2 寄主范围

桃树 X 病植原体可侵染大多数核果类果树,主要寄主植物包括李属植物如桃树(peach)、油桃(nectarine)、甜樱桃(sweet cherry)、李子(plum)、扁桃(almond tree)、杏(apricot tree),及荷兰鸭儿芹(*Cryptotaenia japonica* Hassk)。最近研究还表明许多果园中的杂草也可能是其寄主。经人工接种能感染芹菜。

A.3 表现症状

发病桃树最初的症状是形成黄色的病斑和卷叶,叶片黄化或红化,不规则水浸状斑点,通常沿着中脉向上卷曲。褪绿部分变干,变脆,坏死组织脱落,叶片破碎,穿孔,然后脱落,仅留一簇叶片在枝条的顶端(见图 A.1 和图 A.2)。不久以后,整个植株出现褪绿,叶片脱落,只在枝条的顶部留下一些簇状叶片,幼树在发病后 1~3 年死亡,较成年的植株表现为慢性病症状。樱桃发病,果实上产生了小斑点而且不能成熟。X 病植原体在美洲稠李上的典型症状在整个灌木上出现。叶片提前成熟,从亮黄到变红,在 5 月下旬或 6 月上旬脱落,植株节间大部分变短,稠李病株在表现症状后一般 1~3 年内死亡。



图 A.1 油桃表现桃 X 病害症状



图 A.2 桃上表现桃 X 病害症状

A.4 传播途径

在自然条件下,桃 X 病主要是由叶蝉介体传播和扩散,尤其是桃叶蝉 *Colladonus geminatus*, *Scaphytopius acutus*,深山叶蝉 *Colladonus montanus* 和 *Paraphlepsius irroratus*。在一定程度上,*Fieberiella florii* 和 *Graphocephala confluens* 叶蝉也能传播。远距离以无症带菌苗木传播为主。

A.5 基因组特征

西方 X-病植原体染色质 DNA 的 246046bp 序列,这段序列包括 20 个基因,其中 19 个基因已获得全长序列(Liefting and Kirkpatrick,2003)。

SN/T 3687—2013

附 录 B
(规范性附录)
电子显微镜观察

B.1 试剂试材

B.1.1 锇酸固定液

- a) 巴比妥-乙酸钠缓冲液
 - 巴比妥钠 2.89 g
 - 乙酸钠 1.15 g
- 加双蒸水至 100 mL。
- b) 2%锇酸水溶液
- c) 1%锇酸固定液:
 - 巴比妥-乙酸钠缓冲液 5.0 mL
 - 2%锇酸水溶液 12.5 mL
 - 0.1 mol/L 盐酸 5.0 mL

加双蒸水至 25.0 mL。混合后用 0.1 mol/L 盐酸调至 pH 为 7.2,即为 1%锇酸固定液,4 ℃ 保存备用。

B.1.2 戊二醛固定液

一般为 25%戊二醛水溶液。可配制在除巴比妥以外任何缓冲液中使用,终浓度为 25%。

B.1.3 环氧树脂

- Epon 812 5.0 mL
- 顺丁烯二酸酐(DDSA) 20.0 g
- 邻苯二甲酸二丁酯(D.B.P) 1.75 mL
- 二乙基苯胺(D.M.P-30) 0.4 mL

将 Epon 812 倒入烧杯中,置 80 ℃ 温箱融化备用。按上述比例,顺序加入 DDSA,充分搅拌,待融化呈透明,至室温,再加入邻苯二甲酸二丁酯,仔细搅拌,然后慢慢逐滴加入二乙基苯胺,边加边搅拌,至包埋剂呈红棕色。

B.1.4 Formvar 膜

将聚乙烯醇缩甲醛溶于三氯甲烷,配成 0.2%~3%溶液,存于冰箱备用。制膜时取一块干净玻璃片插入溶液中,取出倾斜待三氯甲烷挥发,用镊子沿玻璃边划痕,将玻璃倾斜入蒸馏水中,薄膜即从玻璃片上脱落下来漂浮于水面,取干净的铜网摆上,压紧,再用一块滤纸覆盖其上,捞起后置于培养皿干燥备用。

B.2 实验步骤

B.2.1 取材

选取呈现早期症状的桃 X 病植原体叶子,用刀片切成整齐的细条,大小为 3 mm²。取健康桃叶做

对照。

B.2.2 固定

采用戊二醛-锇酸双固定法。样品在 25%戊二醛进行前固定 2 h 后, PBS(0.2 mol/L pH 7.4)清洗三次, 然后用 1%锇酸后固定 2 h, PBS 清洗三次。

B.2.3 脱水

采用乙醇和系列梯度脱水。30%乙醇/15 min→50%乙醇/15 min→70%乙醇/15 min→80%丙醇/15 min→90%丙酮/15 min→100%丙酮/15 min。样品可在 70%乙醇中停留过夜。

B.2.4 渗透

脱水后的组织块在丙酮/树脂中渗透 3 d, 再在全树脂中渗透 1 d。

B.2.5 包埋

用环氧树脂做包埋剂。将组织块放在胶囊中央, 滴入包埋剂。于 37℃下 24 h, 60℃下 24 h。

B.2.6 切片

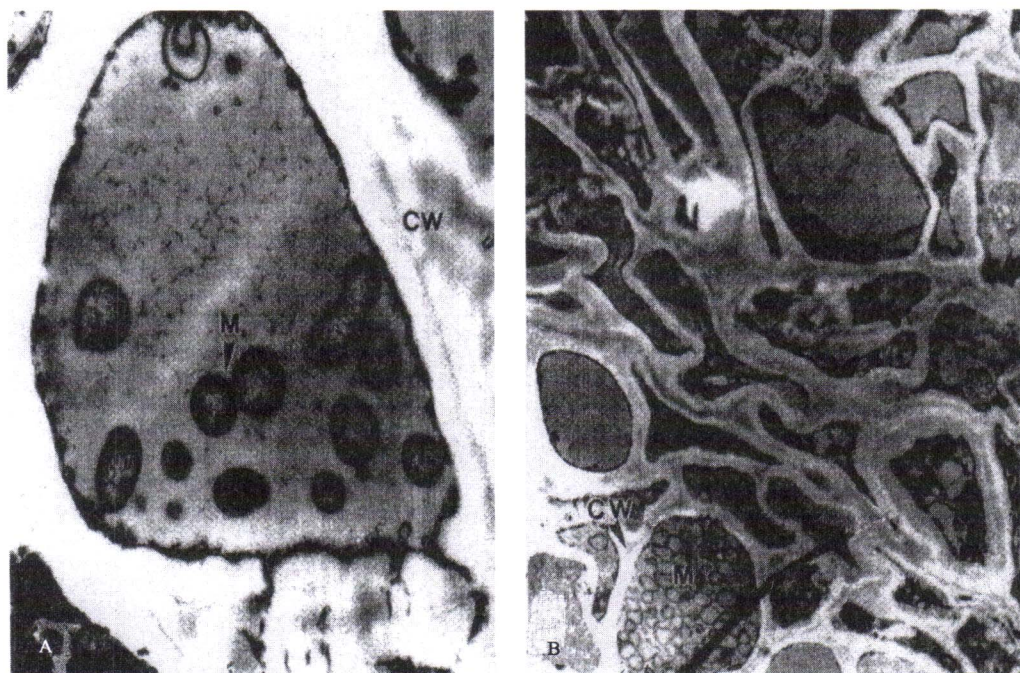
在超薄切片机上将固定的组织块作切片。选择好的切片, 将切片用二甲苯蒸发展开, 用载有 Formvar 膜的铜网捞起, 置培养皿内干燥、保存。

B.2.7 切片染色

采用乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染色。取染色蜡盘数个, 将乙酸铀染液滴入蜡盘上。取带切片的铜网, 插入染色滴中, 染 20 min~30 min, 然后取出铜网, 蒸馏水洗去多余染色液滤纸吸干。将铜网再放入另一蜡盘, 滴入柠檬酸铅染液, 使铜网翻扣在染色液上, 染 20 min~30 min, 再用 0.1 mol/L 氢氧化钠漂洗干净, 滤纸吸干。

B.2.8 显微镜观察

透射电子显微镜观察植原体形态, 如图 B.1, 引自(Guo.Y.H.Walla.J.A 等 1996)。



说明:

A —— 韧皮部少量植原体;

B —— 韧皮部大量植原体聚集;

CW —— 细胞壁;

M —— 植原体放大倍数: A, 24,000 \times ; B, 6,500 \times

图 B.1 感染植原体病的美洲稠李叶柄交叉部电镜图

附 录 C

(规范性附录)

通用引物 Nested-PCR 扩增及测序

C.1 DNA 提取

取大约 0.2 g 叶组织(叶柄、叶脉、韧皮部),加入液氮在无菌研钵中进行充分研磨,将粗汁液转移至 2 mL 离心管,4 ℃ 下 4 500 r/min 离心 5 min。将悬浮液转至新的 2 mL 离心管中。4 ℃ 下 13 000 r/min 离心 15 min,去掉上清液。加入 1 mL CTAB 提取缓冲液;将离心管置于 65 ℃ 水浴中温浴 1 h~1.5 h,每隔 20 min 左右将离心管颠倒混匀;2 000 r/min,4 ℃ 离心 2 min;将离心后的上清转移至一个新的离心管中,加入氯仿/异戊醇(24/1)1 mL,混匀,形成乳浊液;将乳浊液在 13 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min;上清转入新管,加入 800 μ L 预冷的异丙醇,13 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min;弃上清,加入 500 μ L 的 70% 的乙醇,在 13 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min;弃掉上清,干燥沉淀,加入 100 μ L 的灭菌蒸馏水溶解。

其他的 DNA 提取方法也可以借鉴,也可以选择使用商业 DNA 提取试剂盒,提取的 DNA 在 -80 ℃ 的条件下可以冻存 1 年。

C.2 引物序列

引物采用植原体 16Sr DNA 通用引物 P1/P7 和 R16F2n/R16R2,引物序列见表 C.1。

表 C.1 PCR 检测的引物

	引物名称	引物序列 5'-3'	产物/bp
通用引物	P1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA	1 800 左右
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	1 200 左右
	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	

C.3 巢式 PCR 反应体系及参数

C.3.1 16Sr DNA 巢式 PCR(Nested-PCR)扩增反应体系见表 C.2。

表 C.2 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	加样量 μ L
10 \times PCR 反应缓冲液	1 \times	
MgCl ₂	2.5 mmol/L	

表 C.2 (续)

试剂名称	终浓度	加样量 μL
dNTPs	0.2 mmol/L	
正向引物	0.4 mol/L	
反向引物	0.4 mol/L	
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	2.5 U	
DNA 模板	20 ng~1 μg	
补 ddH ₂ O 至		50 μL

取 P1/P7 引物的一扩 PCR 产物 1 μL 稀释 50 倍为引物 R16F2n/R16R2 的 Nested-PCR 二扩模板, 反应体系同第一次 PCR。

C.3.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照: 以健康的桃叶脉或枝条韧皮部提取的总 DNA 为模板;

阳性对照: 以携带有桃 X 病植原体 16Sr DNA 序列的阳性克隆质粒为模板;

PCR 反应的空白对照: 以水代替 DNA 模板。

C.3.3 PCR 的反应参数

P1/P7: 94 $^{\circ}\text{C}$ /2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ /75 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ /95 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ /7 min。R16F2n/R2: 94 $^{\circ}\text{C}$ /2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ /45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ /60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ /90 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ /7 min。

C.3.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶, 以 DNA Marker 作为分子量标记, 进行电泳分析, 电泳结束后在凝胶成像仪观察并记录结果。

C.4 扩增产物测序

将引物 R16F2n/R2 扩增产物序列连接克隆载体 pMD18-T, 并送测序公司测序, 序列号 (GenBank Acc.No.JN882012)

序列结果如下:

```

1      GAAACAGTTG CTAAGACTGG ATAGGAAAAG TAAAGGCATC TTTACTTTTT
51     TAAAAGATCT TCTTTGAAGG TATGCTTAAG GAGGGGCTTG CGACACATTA
101    GTTAGTTGGT AGGGTAAAGG CCTACCAAGA CTATGATGTG TAGCTGGACT
151    GAGAGGTTGA ACAGCCACAT TGGGACTGAG ACACGGCCCA AACTCCTACG
201    GGAGGCAGCA GTAGGGAATT TTCGGCAATG GAGGAAACTC TGACCGAGCA
251    ACGCCGCGTG AACGATGAAG TACCTCGGTA TGTAAGGTTT TTTTATTAAG
301    GAAGAAAAAA GAGTGGAAAA ACTCCCTTGA CGGTACTTAA TGAATAAGCC
351    CCGGCTAATT ATGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACATAAGG GGCGAGCGTT
401    ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGTGCGT AGGCGGTTTA ATAAGTCTAT
451    AGTTTAATTT CAGTGCTTAA CGCTGTTGTG CTATAGAAAC TGTTTTACTA
501    GAGTGAGATA GAGGCAAGCG GAATTCCATG TGTAGCGGTA AAATGCGTAA
551    ATATATGGAG GAACACCAGA GGCGTAGGCG GCTTGCTGGG TCTTTACTGA
601    CGCTGAGGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG

```

```

651   TCCACGCCGT AAACGATGAG TACTAAGTGT CGGGTAAAAC TGGTACTGAA
701   GTTAACACAT TAAGTACTCC GCCTGAGTAG TACGTACGCA AGTATGAAAC
751   TTAAAGGAAT TGACGGGACT CCGCACAAGC GGTGGATCAT GTTGTTTAAT
801   TCGAAGATAC ACGAAAAACC TTACCAGGTC TTGACATTTT CTTGCGAAGT
851   TATAGAAATA TAATGGAGGT CATCAGGAAA ACAGGTGGTG CATGGTTGTC
901   GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTAGGTAA GTCCTAAAAC GAGCGCAACC
951   CTTGTCGTTA GTTGCCAGCA TGTAATGATG GGGACTTTAA CGAGACTGCC
1001  AATGAAAAAT TGGAGGAAGG TGGGGATTAC GTCAAATCAT CATGCCCCTT
1051  ATGATCTGGG CTACAAACGT GATACAATGG TTGATACAAA GAGTAGCTGA
1101  AACGCGAGTT CTTAGCCAAT CTCAAAAAAT CAATCTCAGT TCGGATTGAA
1151  GTCTGCAACT CGACTTCATG AAGTTGGAAT CGCTAGTAAT CGCGAATCAG
1201  CATGTCGCGG TGAATACGTT CTCGGGGTTT GTACACACCG CCCGTCA

```

C.5 结果判定

通用引物 P1/P7, 预计扩增片段约为 1.8 kbp, 引物 R16F2n/R2, 预计扩增片段约为 1.2kbp。

检测样品经通用引物 R16F2n/R2 扩增出现对应目的片段, 并且二扩产物经测序与 C.4 序列一致, 则可判定该样品携带桃 X 病植原体。

附录 D (规范性附录) RFLP 指纹图谱分析

D.1 引物序列

R16F2n:5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2:5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

D.2 PCR 反应体系

同 C.3.1。

D.3 PCR 反应参数

同 C.3.3。

D.4 RFLP 分析

以 R16F2n/R16R2 引物扩增产物进行 RFLP。

经通用引物 R16F2n/R16R2 扩增所得到的序列通过软件进行 RFLP 图谱分析(Wei W et al., 2007),选择 17 种限制性内切酶(*Alu* I、*Bam* H I、*Bfa* I、*Bst* UI、*Dra* I、*Eco* R I、*Hae* III、*Hha* I、*Hinf* I、*Hpa* I、*Hpa* II、*Kpn* I、*Mbo* I、*Mse* I、*Rsa* I、*Ssp* I、*Taq* I)酶切后,对比图 D.1 提供的桃 X 植原体 16Sr DNA 的 RFLP 酶切图谱(Lee et al.,1998)进行结果分析判断。

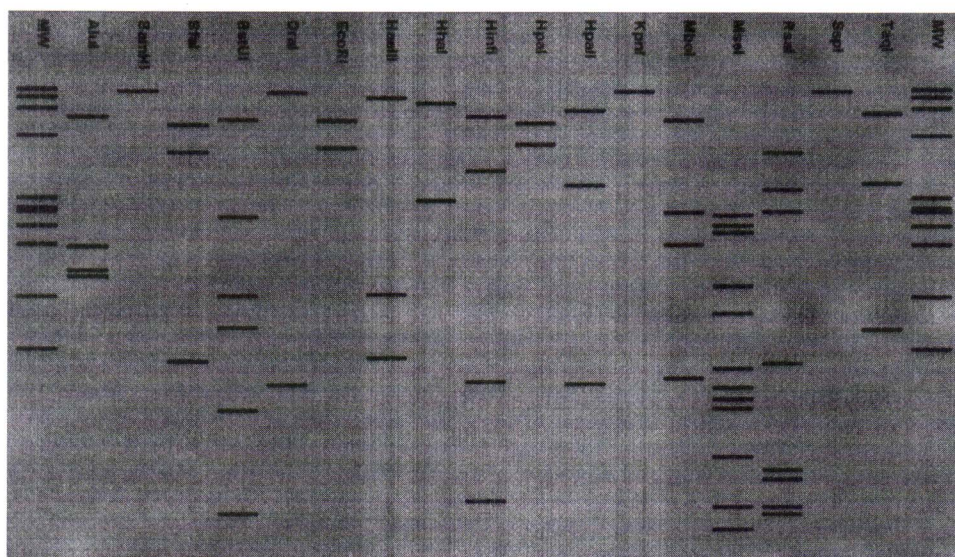


图 D.1 引起桃 X 病的植原体 RFLP 酶切图谱

D.5 结果判断

通用引物 R16F2n/R2 扩增产物的 RFLP 分析片段大小与桃 X 植原体标准图谱相符,可判定该样品携带桃 X 病植原体。

参 考 文 献

- [1] Yan Zhao, Wei Wei, Ing-Ming Lee etc. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-Agricultural Research Service, Beltsville, MD 20705, U.S.A.
- [2] B. N. Ohanvantali and F. Kappel. Peach X-disease in southwestern Ontario. Canadian Plant Disease Survey 58:3, 1978.
- [3] Guo, Y. H., Walla, J. A., Cheng, Z.-M., and Lee, I.-M.. X-disease confirmation and distribution in chokecherry in North Dakota. Plant Dis. 1996, 80:95-102.
- [4] D. E. GUNDERSEN, I.-M. LEE, D. A. SCWF etc. Genomic Diversity and Differentiation among Phytoplasma Strains in 16Sr RNA Groups I (Aster yellows and Related Phytoplasma) and III (X-Disease and Related Phytoplasmas). INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY Jan. 1996, p. 64-75.
- [5] Ing-Ming Lee, Dawn E. Gundersen-Rindal, Robert E. Davis and Irena M. Bartoszyk Revised Classification Scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16Sr RNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology. 1998, 48:1153-1169.
- [6] Liping Wang, Ni Hong, Marta Martini etc. Molecular characterization of two phytoplasma strains associated with X disease in peach in Canada. Phytopathogenic Mollicutes. 2012, Vol. 2(1):9-14.
- [7] Wei W, Davis RE, Lee I-M and Zhao Y. Computer simulated RFLP analysis of 16Sr RNA genes; identification of ten new phytoplasma groups. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007, 57:1855-1867.
-