

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4072—2014

梨衰退植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of pear decline *Phytoplasma*

2014-11-19 发布

2015-05-01 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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、福建农林大学。

本标准主要起草人：王念武、陈劲松、黄伙水、沈建国、张永宏、翁瑞泉、牟海青、胡方平。

梨衰退植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了梨衰退植原体的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境梨树的果苗、组织繁殖材料及媒介昆虫中可能携带梨衰退植原体的检疫鉴定。

2 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件

2.1

聚合酶链式反应 **polymerase chain reaction; PCR**

PCR 是在聚合酶的作用下,以 DNA 为模板,以 dNTP 为底物,以两条反向的引物对为起点,根据碱基配对原则,按照 DNA 的核苷酸顺序,合成与模板互补的 DNA 链的过程,是一种体外基因扩增技术。

2.2

DNA 阳性对照 **positive control**

以含有梨衰退植原体的 DNA 提取液或是以携带有梨衰退植原体 16S rRNA 序列的阳性克隆质粒为模板。

2.3

DNA 阴性对照 **negative control**

以健康的梨树叶脉或枝条韧皮部提取的总 DNA 为模板。

3 梨衰退植原体基本信息

梨衰退植原体 Pear decline phytoplasma 属于软壁菌门(Tenericutes)、软球菌纲(Mollicutes)、菌原体目(Mycoplasmatales)、菌原体科(Mycoplasmataceles)、植原体属(*Phytoplasma*)、苹果畸形组 Apple proliferation group(16SrX)。

其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据梨衰退植原体的 16S rRNA 基因碱基序列信息,采用植原体 16S-23S rRNA 通用引物和梨衰退植原体特异性引物相结合的巢式 PCR 方法,对该植原体进行鉴定。

5 仪器、用具和试剂

5.1 仪器

PCR 仪、高压灭菌锅、制冰机、高速冷冻离心机、离心机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、电泳仪、凝胶成像系统、天平(感量:0.001 g)、高温干燥箱、生物安全柜、水浴锅等。

5.2 用具

研钵和研棒、可调移液器(2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、枪头(10 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)。

5.3 试剂

DNA 提取试剂见附录 B, 巢式 PCR 检测试剂见附录 C。

6 检测鉴定方法

6.1 症状检查

仔细观察梨树的种苗、枝条、叶片等, 症状描述参见附录 A。

6.2 检疫样品的采集及制备

取有疑似症状的梨树叶、枝条等材料进行实验室检测鉴定; 如发现有梨木虱, 一并采集送实验室检测鉴定。

6.3 样品 DNA 提取

将采集的样品(包含梨树枝、叶、梨木虱)进行 DNA 提取, 具体操作见附录 B。

6.4 通用引物和特异性引物的巢式 PCR 扩增、凝胶电泳

梨衰退植原体 16S rDNA 的扩增使用巢式 PCR 方法, 第一次 PCR 扩增使用的通用引物为 P1/P7, 第二次 PCR 扩增采用的特异性引物为 Apf1/rpds1。

具体操作见附录 C

7 结果判定

在 6.4 检测中, 通过通用 P1/P7 及特异性引物 Apf1/rpds1 两对引物进行巢式 PCR 扩增, 若第一次和第二次扩增产物经凝胶电泳检测结果均为阳性, 则判定该样品携带梨衰退植原体; 若第一次扩增产物经凝胶电泳检测结果为阴性, 第二次扩增产物经凝胶电泳检测结果为阳性, 则判定该样品携带梨衰退植原体; 其他情况则判定该样品未携带梨衰退植原体。具体的阴性, 阳性的判定见附录 C。

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。对检出的梨衰退植原体样品应保存于一 20 $^{\circ}$ C 冰箱中, 以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌杀死植原体后方可做丢弃处理。

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。

8.3 复核

由国家质量监督检验检疫总局指定的单位或人员负责。主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。

附 录 A

(资料性附录)

梨衰退植原体相关资料

A.1 分类地位

梨衰退植原体 Pear decline phytoplasma 属于软壁菌门(Tenericutes),软球菌纲(Mollicutes),菌原体目(Mycoplasmatales),菌原体科(Mycoplasataceles),植原体属(*Phytoplasma*),苹果畸形组 Apple proliferation group(16SrX)。

A.2 地理分布

非洲:利比亚。

大洋洲:澳大利亚。

欧洲:罗马尼亚,德国,意大利,瑞士,奥地利,捷克,斯洛伐克,法国,摩尔多瓦,荷兰,斯洛文尼亚,西班牙,南斯拉夫,希腊,英国,比利时(未证实),俄罗斯(未证实)。

北美洲:加拿大,美国。

亚洲:中国台湾。

A.3 寄主范围

主要侵染梨属 *Pyrus* spp.植物,以梨危害最为严重,梨树中,目前已知有 French pear(*Pyrus communis*),Japanese pear(*P. pyrifolia*),Chinese pear(*P. ussuriensis*)等,均属于极易感染的品种。该病菌还可侵染榲桲 *Cydonia oblonga*,有时也侵染以榲桲为砧木嫁接而成的树木。

A.4 形态特征

病原体体外培养至今未能成功。类菌原体主要呈丝状,通常为具有3层膜的分枝体,但缺少硬的细胞壁。

A.5 生物学特性

病害可通过嫁接传播,但成功率较低,仅33%,实验条件下,用昆虫介体接种传染,在介体取食后两个月,植株便出现症状,接穗种类和树龄似乎不影响梨衰退病的发生。

Schneider(1962)报道,在病株较细的次生叶脉的狭小筛管中存在大量类菌原体颗粒,但是在韧皮部的次生筛管中,类菌原体很少存在。现在认为,由类菌原体感染寄主产生的毒素代谢物由细的次生叶脉向次生筛管局部转移,在那里引起植株坏死。

A.6 传播途径

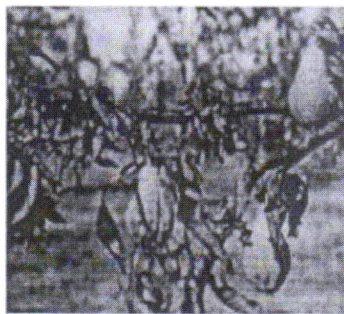
自然传播主要是通过昆虫介体的迁移,但这通常仅在树木之间、果园之间与野生寄主之间作近距离

传播。大约在 1832 年,梨木虱 *Cacopsylla pyricola* 由欧洲传入美国,害虫不仅传播梨衰退病,而且在它取食时经唾液进入植物体内的毒素使植物遭受严重损失。这种昆虫介体在海拔较高的地区较为普遍。在瑞士,海拔 600 m~1 000 m 的地方也存在这种介体,这种害虫不仅从梨树上迁移,而且以成虫在树皮裂缝中越冬。介体几小时就能获得类菌原体,但要成为持久性传毒者至少需 3 周时间。其他昆虫介体还未详细阐述过。但 Lemoine(1984)认为 *C.pyri* 肯定是梨衰退病的传播介体。

在国际贸易中,病菌随带菌的梨树植株、砧木、接穗或昆虫介体作远距离传播。

A.7 危害症状

该病菌引起 2 种类型的症状:急性衰退(见图 A.1)和慢性衰退(见图 A.2)。急性衰退表现为植株快速凋萎,叶片转成暗红色、干燥,罹病植株在几天至数周内死亡。慢性衰退发生在以耐病或抗病植物(*Pyrus communis*、*P.betuliifolia*、*P.calleryana* 或 *Cydonia oblonga*)为砧木的植株上,典型症状为叶片卷曲,秋季叶片过早变红并脱落。在随后的几年中,植株可能会变得树势衰弱、树叶减少、花少果疏甚至绝产。然而有些病株在呈现急性衰退前,会先表现慢性衰退、红叶及卷叶等病症。急性衰退极易出现在夏、秋两季,或病株面临干热的环境压力时,也助于此类病症之表现。除此之外,栽培梨树之根砧对于病症的类型也有影响,研究发现使用 *P.pyrifolia*、*P.ussuriensis* 及 *P.communis* 为砧木时,则罹病株更易表现出急性衰退型病症。



a)



b)

图 A.1 急性衰退症状

SN/T 4072—2014



a)



b)



c)

注：以上图片引自 EPPO 官方网站：http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Pear_decline/PHYPPY_images.htm。

图 A.2 慢性衰退症状

附 录 B
(规范性附录)
DNA 提取

- B.1** 取大约 0.1 g 样品材料(叶柄、叶脉、韧皮部)或是媒介昆虫,加入液氮在无菌研钵中进行充分研磨。
- B.2** 将粗汁液转移至 1.5 mL 离心管,4 ℃下 4 000 r/min 离心 8 min。
- B.3** 将上清液转至新的 1.5 mL 离心管中,4 ℃下 12 000 r/min 离心 15 min。
- B.4** 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。
- B.5** 12 000 r/min,4 ℃离心 2 min。
- B.6** 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。
- B.7** 将乳浊液在 12 000 r/min,4 ℃离心 5 min。
- B.8** 将上清转入新管,加入 800 μ L 预冷的异丙醇,12 000 r/min,4 ℃离心 10 min。
- B.9** 弃上清液,加入 500 μ L 的 70% 的乙醇,在 12 000 r/min,4 ℃离心 5 min。
- B.10** 弃掉上清液,干燥沉淀,加入 100 μ L 的灭菌蒸馏水溶解,置于-20 ℃冰箱内备用,长期应在-80 ℃的条件冻存。

注:其他的 DNA 提取方法也可以借鉴,可以选择使用稳定性好的商业 DNA 提取试剂盒,对于量少的样品,建议使用微量 DNA 提取试剂盒试进行 DNA 提取。

附录 C

(规范性附录)

通用引物和特异性引物 Nested-PCR 扩增检测

C.1 引物序列

引物采用植原体 16S-23S rRNA 通用引物 P1/P7 和特异性引物 Apf1/rpds1, 引物序列见表 C.1。

表 C.1 Nested-PCR 检测的引物

引物	引物名称	引物序列 5'-3'	引物出处	产物长度
通用引物	P1 P7	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T CGT CCT TCA TCG GCT CTT	Smart et al., 1996	1 800 bp 左右
特异性引物	Apf1 rpds1	GTG TTG GGT TAA ACC AGT GC CCA AGC CAT TAT TAA TTT TTA	林长平, 2007	790 bp 左右

C.2 巢式 PCR 反应体系及参数

C.2.1 巢式 PCR (Nested-PCR) 扩增反应体系

PCR 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 μL
10× <i>Taq</i> 酶缓冲液	1×	
MgCl ₂	2.0 mmol/L	
dNTPs	0.2 mmol/L	
正向引物	0.4 $\mu\text{mol/L}$	
反向引物	0.4 $\mu\text{mol/L}$	
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	2.5 U	
DNA 模板	50 ng~1 μg	
补 ddH ₂ O 至		25 μL

取 P1/P7 引物的第一次 PCR 产物 1 μL 稀释 50 倍为引物 Apf1/rpds1 的 Nested-PCR 第二次扩增模板, 反应体系同第一次 PCR。

C.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照: 以健康的梨树叶脉或枝条韧皮部提取的总 DNA 为模板。

阳性对照: 以含有梨衰退植原体的 DNA 提取液或是以携带有梨衰退植原体 16S-23S rDNA 序列的阳性克隆质粒为模板。

PCR 反应的空白对照:以灭菌双蒸水代替 DNA 模板。

C.2.3 Nested-PCR 反应条件

第一阶段 PCR(引物 P1/P7):94 ℃/5 min;95 ℃/30 s,60 ℃/60 s,72 ℃/90 s,35 个循环,72 ℃/10 min。

第二阶段 PCR(引物 Apf1/rpds1):94 ℃/5 min;94 ℃/30 s,55 ℃/30 s,72 ℃/45 s,35 个循环,72 ℃/7 min。

C.3 琼脂糖凝胶电泳的成像

制备 1.5% 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 Nested-PCR 阴性、阳性结果判定

通用引物 P1/P7,预计扩增片段约为 1 800 bp,特异性引物 Apf1/rpds1,预计扩增片段约为 790 bp。当阳性对照出现目标片段,而阴性对照及空白对照未出现目标片段时,实验结果有效。

在实验结果有效的情况下,若第一次 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测结果出现 1 800 bp 的目标条带时,则判定第一次的 PCR 结果为阳性,否则判定为阴性;若第二次 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测结果出现 790 bp 的目标条带时,则判定第二次的 PCR 结果为阳性,否则判定为阴性。