



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4344—2015

杏褪绿卷叶植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of Apricot
chlorotic leafroll phytoplasma

2015-09-02 发布

2016-04-01 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准起草人：黄新、侯立华、郭欣硕、牟海青、赵文军、张琪、张琰、朱水芳、王有福。

杏褪绿卷叶植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了杏褪绿卷叶植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境杏、桃及李子苗木中杏褪绿卷叶植原体的检疫和鉴定。

2 杏褪绿卷叶植原体基本信息

学名: *Candidatus Phytoplasma prunorum*

异名: Apricot chlorotic leafroll phytoplasma; European stone fruit yellows phytoplasma; Apricot chlorotic leaf roll virus; Peach chlorotic leaf roll virus

分类地位: 软壁菌门, 柔膜菌纲, 无胆甾原体目, 无胆甾原体科, 植原体候选属, 16SrX-B 植原体组。

传播途径: 田间近距离扩散以媒介叶蝉 (*Fieberiella florii*) 和嫁接传播为主, 远距离以无症带菌苗木传播为主。

杏褪绿卷叶植原体的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

杏褪绿卷叶植原体的生物学特性和基因序列等分子生物学信息是该检疫鉴定方法的依据, DAPI 荧光染色法和透射电子显微镜法在本标准中作为一种初步筛选植原体的方法; PCR 技术与 RFLP 技术结合作为鉴定杏褪绿卷叶植原体的准确方法。

4 仪器设备和主要试剂

4.1 仪器设备

PCR 仪、超净工作台、灭菌锅、制冰机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、台式小型离心机、超低温冰箱、常规冰箱、涡旋振荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统、透射电子显微镜、荧光显微镜。

4.2 主要试剂

植原体细胞富集缓冲液 (100 mL): 无水磷酸氢二钾 1.67 g, 磷酸二氢钾 0.41 g, 蔗糖 10 g, 牛血清白蛋白 0.15 g, 聚乙烯吡咯烷酮 2 g, 维生素 C 0.53 g, 用 5 mol/L 的 KOH 调节 pH 值至 7.6。

DNA 提取缓冲液: 2% 十六烷基三甲基溴化铵 (50 °C 左右溶解), 1.4 mol/L 氯化钠, 20 mmol/L 乙二胺四乙酸, 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)。

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯。

5 病菌的鉴定

5.1 症状检查

仔细观察寄主植物种苗、叶片等, 感病植株典型症状是卷叶, 叶片沿着从叶柄到叶尖的直线卷曲, 叶

片脉间失绿,不规则或形成圆锥形或多角形轮廓。症状描述参见附录 A。

5.2 DAPI 染色

选取幼嫩组织(叶脉、侧芽),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,故每样品需选取不同部位的幼嫩材料进行检测。

5.3 通用引物 PCR 凝胶电泳及 RFLP 检测

按附录 B 提取 DNA。

通用引物 PCR 凝胶电泳及 RFLP 检测见附录 C。

5.4 特异性引物 PCR 凝胶电泳检测

特异性引物 PCR 凝胶电泳检测见附录 D。

5.5 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 E)。

6 结果判定

6.1 表现症状与 A.2 描述一致,并且 DAPI 染色观察结果显示蓝色荧光或者电镜超薄切片在韧皮部筛管细胞中存在大量植原体,可初步判定为植原体。

6.2 在 5.3 检测中,若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,而且 RFLP 分析片段大小与描述相符,可判定该样品携带 16S rX 组的植原体。

6.3 在 5.4 检测中,若通过 ECA-F、ECA-R 引物 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测结果为阳性,在 237 bp 处检测到特异性扩增条带,可判定该样品携带杏褪绿卷叶植原体。

7 样品保存

7.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出杏褪绿卷叶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应经高压灭菌后方可处理。

7.2 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。

7.3 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)

杏褪绿卷叶植原体其他相关信息

A.1 形态特征

形态为杆状或者球形颗粒,是在大小和形态上可变的多样性结构。

A.2 症状特征

感病植株典型症状是卷叶,叶片沿着从叶柄到叶尖的直线卷曲,叶片脉间失绿,不规则或形成圆锥形或多角形轮廓。该病原物也能侵染李树,症状与感病杏树相似但不典型,叶片小、红色,形成圆柱状卷曲。

A.3 寄主范围

寄主主要是杏、桃和李子,此外,也能寄生在一些杂草如田旋花和狗牙根自然寄主上。

A.4 分布

除了在南非未经证实外,杏褪绿卷叶植原体在欧洲被发现。法国(杏栽培地区普遍存在)、德国、希腊、意大利、匈牙利、罗马尼亚、西班牙、瑞士等均有分布。

附 录 B
(规范性附录)
植原体 DNA 的提取

B.1 植原体细胞的富集

称取新鲜样品叶中脉 1.5 g,加入 7 mL~8 mL 新制备的提取缓冲液,50 mg 的石英砂,于研钵中研磨。冰上放置 10 min~15 min,加入 5 mL 相同的缓冲液并摇晃均匀;将悬浊液转移至 15 mL 离心管,5 000 r/min,使用预冷的离心转头(Beckman JA 20)4 ℃离心 5 min,将上清液移至另一个离心管中,19 000 r/min 离心 20 min,干燥沉淀并用 60 ℃预热的 2 mL 2% CTAB 溶液,重悬沉淀;60 ℃水浴中温浴 10 min~20 min,将 1 mL 的溶液转至干净的 2 mL 的微管中,用于接下来的 DNA 提取。

B.2 DNA 提取

将 1 mL 植原体细胞富集液转移至 2 mL 离心管。加入 1 mL DNA 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;将离心后的上清液转移至一个新的离心管中,加入三氯甲烷/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;将上清液转入新管,加入 RNase 2 μL,37 ℃温浴 30 min;加入三氯甲烷/异戊醇(24/1)1 mL,13 000 r/min,4 ℃离心 5 min;上清液转入新管,加入 800 μL 预冷的异丙醇,13 000 r/min,4 ℃离心 10 min;弃上清液,加入 500 μL 的 70% 的乙醇,在 13 000 r/min,4 ℃离心 5 min;弃掉上清液,干燥沉淀,加入 100 μL 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 ℃的条件下可以冻存一年。

附 录 C
(规范性附录)
通用引物 PCR 扩增以及 RFLP 分析

C.1 引物序列

植原体通用引物:P1:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A-3',P7:5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'。

C.2 PCR 反应体系及参数

C.2.1 PCR 反应体系

见表 C.1。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 反应缓冲液	1×
MgCl ₂	2.5 mmol/L
dNTPs	0.2 mmol/L
正向引物	0.4 mol/L
反向引物	0.4 mol/L
Taq DNA 聚合酶	2.5 U
DNA 模板	1 L
补 H ₂ O 至	50 L
注：DNA 模板的取量应根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节。	

C.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

C.2.2.1 阴性对照：以健康的杏叶片 DNA 为模板。

C.2.2.2 阳性对照：以携带有杏褪绿卷叶植原体 16S rDNA 序列的 DNA 为模板。

C.2.2.3 空白对照：设两个，一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以 H₂O 代替样品)，二是 PCR 反应的空白对照(以 H₂O 代替 DNA 模板)。

C.2.3 PCR 的反应参数

P1/P7:94 ℃/5 min;94 ℃/30 s,55 ℃/30 s,72 ℃/1 min,40 个循环;72 ℃/10 min。

注：不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

C.3 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

SN/T 4344—2015

仪观察并记录结果,分子大小 1 767 bp 左右。

C.4 RFLP 分析

所用限制性内切酶为 *Alu* I,反应体系:总体系 20 μ L;1 \times 缓冲液,2 U *Alu* I,10 μ L 的 PCR 产物。置于 37 $^{\circ}$ C 温育至少 4 h,电泳同 C.3。

C.5 结果判断

对 X 组 GeneBank 序列用 *Alu* I 分析,其共有序列为 476 bp、229 bp、189 bp 和 91 bp。可判定该样品携带杏褪绿卷叶植原体或 16SrX 组的成员。



附 录 D
(规范性附录)
特异性引物 PCR 凝胶电泳检测

D.1 特异性引物序列

ECA-F: 5'-AAT AAT CAA GAA CAA GAA GT, ECA-R: 5'-GTT TAT AAA AAT TAA TGA CTC。

D.2 PCR 反应体系

同 C.2.1。

D.3 PCR 的反应参数

ECA-F/ECA-R: 94 °C/5 min; 94 °C/30 s, 53 °C/40 s, 72 °C/30 min, 40 个循环; 72 °C/10 min。

注: 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

D.4 琼脂糖凝胶电泳

同 C.3。

D.5 结果判定

琼脂糖凝胶电泳出现 237 bp 的特异性扩增片段, 可以判定所测样品携带杏褪绿卷叶植原体。

附 录 E
(规范性附录)
透射电子显微镜观察

E.1 试剂试材

E.1.1 锇酸固定液

巴比妥-乙酸钠缓冲液的 1% 锇酸固定液

①巴比妥钠	2.89 g
乙酸钠	1.15 g
加双蒸水至 100 mL	
②取 2% 锇酸水溶液	12.5 mL
①液	5.0 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, 在冰箱保存备用。

E.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的任何缓冲液中使用, 终浓度为 25%。

E.1.3 环氧树脂

Epon 812	5 mL
顺丁烯二酸酐(DDSA)	2 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 °C 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。

E.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, 然后将玻璃倾斜放入蒸馏水中, 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。

E.2 实验步骤

E.2.1 取材

选取呈现早期症状的杏褪绿卷叶植原体叶子, 用刀片切成整齐的细条, 大小为 3 mm²。取健康杏叶做对照。

E.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 pH7.4) 清洗三次, 然后用 1% 锇酸后固定 2 h, PBS 清洗三次。

E.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% 丙酮/15 min→90% 丙酮/15 min→100% 丙酮/15 min。样品可在 70% 乙醇中停留过夜。

E.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。

E.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 °C 下 24 h, 60 °C 下 24 h。

E.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。

E.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。

E.2.8 显微镜观察

透射电子显微镜观察植原体形态。
