



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3277—2012

鳄梨日斑类病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of avocado sunblotch viroid

2012-10-23 发布

2013-05-01 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：郑耘、陈枝楠、张永江、卢小雨、冯建军、汪莹、李一农、刘新娇。

鳄梨日斑类病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中对鳄梨日斑类病毒的 RT-PCR、往返聚丙烯酰胺凝胶电泳和生物学测定三种检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境鳄梨种苗中鳄梨日斑类病毒的检疫鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样规则

3 原理

鳄梨日斑类病毒(avocado sunblotch viroid, ASBVd)属于鳄梨日斑类病毒科(Avsunviroidae)鳄梨日斑类病毒属(Avsunviroid)。该类病毒的分子生物学和生物学特性(参见附录 A)是检疫鉴定的主要依据。

4 仪器设备及设施、用具及试剂

4.1 仪器设备及设施

天平(感量,1/10 000 g)、pH 计、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、隔离检疫温室、恒温水浴、低温冰箱等。

微量移液器(2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、研钵、离心管、花盆、消毒土等。

4.2 RT-PCR 检测试剂

见附录 B。

4.3 往返聚丙烯酰胺凝胶电泳检测试剂

见附录 C。

5 样品制备

抽样按照 SN/T 2122 的规定执行。

5.1 种子类

随机抽取 100 粒种子,将其分为五组,在适宜的发芽温度(20 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C)条件下催芽,直至长出第一对真叶。随机抽取 20 株苗叶片,每株取 1 g 叶片,制备成一个样品。

5.2 苗木类

将鳄梨苗木等繁殖材料种植在隔离温室中,于 25 ℃ 生长并观察症状。取 1 g 表现症状和无症状植株的叶片(或花芽),制备成一个样品。

6 检测方法

6.1 RT-PCR 检测

方法见附录 B。

6.2 往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定

方法见附录 C。

6.3 生物学测定

方法见附录 D。

7 结果判定

如 RT-PCR 检测结果为阳性,往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,或生物学测定也为阳性,可判定待检样品带有鳄梨日斑类病毒。如 RT-PCR 检测结果为阴性,往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,或生物学测定结果也为阴性,则可判定待检样品不带有鳄梨日斑类病毒。如 RT-PCR 检测结果、生物学测定结果,或往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定中,任意一个为阳性,而其余为为阴性,则需重做实验。

8 样品和档案保存

8.1 样品保存

经检测确定携带鳄梨日斑类病毒的样品干燥后在 -80 ℃ 冰箱保存 1 年。在鳄梨繁殖材料中发现该类病毒的,采集叶片、花芽等类病毒浓度较高的材料干燥处理保存。检测原始记录、照片等文档按有关规定做好登记、标记和存档,以便必要时复核。

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、登记时间、实验地点、检测方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。RT-PCR 检测应有电泳结果和往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定需有图片,生物学测定应有鉴别寄主的症状照片。

附 录 A

(资料性附录)

鳄梨日斑类病毒生物学特性

A.1 病原及其特性

ASBVd 为棒状结构,是一条共价闭合的单链环状 RNA 分子,由长度为 247 个核苷酸残基组成,相对分子质量为 0.8×10^5 da。ASBVd 序列独特,富含 A-U 碱基,与其他类病毒的同源率低,具有自我切割的特性。ASBVd 在寄主的叶绿体内增殖和积累,滴度很高,有时与寄主 5S RNA 的浓度相当。

A.2 寄主范围

寄主范围仅限于樟科鳄梨属植物,表明其与寄主植物具有高度的特异性。

A.3 病害症状

受 ASBVd 侵染的鳄梨(*Persea americana* Mill.),树势衰弱,在果实上出现黄色、白色或粉红色的斑纹,有时水果上能形成下陷的火山口状病斑,病斑可为黄色、绿色和深红色,受害果实市场价值降低;还可以在茎、子叶上引起黄色、橙色或白色的下陷的斑或点;在叶片上引起褪绿和扭曲。受害植株比健康植株稍矮,但较难区分。田间 ASBVd 的典型症状是枝杈表皮上的条纹和斑点。

ASBVd 侵染鳄梨后,造成严重的经济损失。病果树与健康果树相比,产果数量减少,产量下降 30% 以上,树干矮小,枝干朝地面弯曲,树形呈扁平状,平伸的树形增加了暴露日光的面积,易被强阳光灼伤。果实上的条纹影响了鳄梨的市场价值。

A.4 分布地区

在很多种植鳄梨的国家都有该病的发生,包括澳大利亚、以色列、秘鲁、南非、美国及委内瑞拉。

A.5 传播方式

ASBVd 可通过嫁接、种子、花粉和机械等方式传播,但至今尚无昆虫传播的报道。该类病毒可通过嫁接方式在樟科植物之间传播,也能通过花芽、接穗、树皮等嫁接方式传播,自然的根接也能传播。潜伏侵染的植株极易种子传播,种传率为 80%~100%,被传播的后代植株也不表现症状;而显症的植株种传率较低,常小于 5%,被传播的后代植株也表现症状。在实验条件下,甲虫(*Apis mellifera*)能导致低频率(1.8%~3.3%)的花粉传播。

SN/T 3277—2012

附录 B

(规范性附录)

RT-PCR 检测

B.1 试剂

B.1.1 RNA 抽提

采用 Trizol 法提取总 RNA。

B.1.2 50×TAE

Tris	242 g
冰醋酸	52.1 mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g

加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

B.1.3 6×加样缓冲液

溴酚蓝	0.25%
蔗糖水溶液	40%(质量浓度)

B.2 试验步骤

B.2.1 总 RNA 提取

B.2.1.1 取样

鳄梨苗木取叶片部分,花取花芽,果实取表现症状的果皮。

B.2.1.2 RNA 抽提

称取鳄梨苗木的叶片、或花芽、或果皮样品(被检测样品、阳性样品为带有鳄梨日斑类病毒的植物材料、阴性样品为不带有鳄梨日斑类病毒的材料)0.1 g,液氮充分研磨。加入 1 mL Trizol,混匀,倒入 1.5 mL 离心管中。加入 0.2 mL 三氯甲烷,剧烈振荡 15 s,4℃条件下 12 000g 离心 10 min,小心吸取上层水相至新离心管中。加入等体积异丙醇,混匀,-20℃静止 10 min,4℃条件下 12 000g 离心 15 min,弃上层水相。加入 1 mL 75%乙醇,重悬沉淀,4℃条件下 8 000g 离心 10 min,弃上层乙醇相,干燥沉淀。加入 30 μL DEPC-H₂O,置于 50℃条件下 5 min 溶解沉淀,存于-80℃条件下备用。也可采用供应商推荐的试剂盒抽提 RNA。

B.2.2 RT-PCR 反应

B.2.2.1 引物

根据鳄梨日斑类病毒基因上游保守序列设计特异性引物对,上游引物(PAB-FP)与第 68 至 87 个核苷酸序列一致,下游引物(PAB-RP)与第 88 至 104 个核苷酸序列互补,具体序列如下:

PAB-FP:5'-AAGTCGAAACTCAGAGTCGG-3'

PAB-RP;5'-GTGAGAGAAGGAGGAGT-3'

B.2.2.2 cDNA 合成

按下列组分(见表 B.1)制备 RT 反应混合液 20 μL 。反应条件:25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 1.5 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 2 min~3 min。

表 B.1 组分

试剂名称	加样量/ μL
模板 RNA	2 μL
反向引物(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
5 \times AMV 缓冲液	4 μL
dNTP(10 mmol/L)	2 μL
AMV 反转录酶(5 U/ μL)	1 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	1 μL
DEPC 处理过的 H_2O	9 μL

B.2.2.3 反应程序

在冰上依次将下列组分(见表 B.2)加入 PCR 反应管中,充分混匀后进入热循环反应:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 2 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,共 40 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min。

表 B.2 组分

试剂名称	贮备液浓度	终浓度	加样量/ μL
10 \times PCR 反应缓冲液	10 \times	1 \times	2.5
氯化镁(MgCl_2)	25 mmol/L	2.0 mmol/L	2
dNTP	10 mmol/L	0.4 mmol/L	1
正向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.25
反向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.25
Taq 酶	5 U/ μL	1.5 U/test	0.3
cDNA			3
补加水至总体积			25 μL

B.2.3 琼脂糖电泳**B.2.3.1 制备凝胶**

加入 TAE 配置质量浓度为 2% 的琼脂糖,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

B.2.3.2 加入溴化乙锭

加入浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溴化乙锭,混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插入样品梳。待凝胶凝固后,拔出梳子,加入足够量的 TAE(缓冲液盖过凝胶表面约 1 mm)。

SN/T 3277—2012

B.2.3.3 电泳

吸取 10 μL 反应液,加入 2 μL 6 \times 加样缓冲液混合均匀,将其和适合的 DNA 相对分子质量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统下观察并保留结果。

B.3 结果判断

阳性对照在 247 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。结果达到质控要求,且待测样品在 247 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

附 录 C
(规范性附录)
往返聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

C.1 试剂**C.1.1 RNA 的抽提**

采用 Trizol 法提取总 RNA。

C.1.2 10×TBE

Tris	890 mmol/L
硼酸	890 mol/L
乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	20 mmol/L
调 pH 至 8.3, 加双蒸水定容至 1 L。	

C.1.3 加样缓冲液

TBE	
甘油	60%
溴酚蓝	0.06%
二甲苯	0.06%

C.1.4 固定液

水	89%
乙醇	9.5%
冰醋酸	1%

C.1.5 染色液

1 g 硝酸银加双蒸水定容至 500 mL。

C.1.6 显色液

氢氧化钠	0.4 mol/L
甲醛	4 mL
用双蒸水定容至 1 L。	

C.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)**C.2.1 RNA 的提取****C.2.1.1 取样**

鳄梨苗木取叶片部分, 花取花芽。

C.2.1.2 抽提 RNA

称取鳄梨苗木的叶片或花芽样品(被检测样品、阳性样品-带有鳄梨日斑类病毒的植物材料、阴性样品-不带有鳄梨日斑类病毒的材料)2 g,液氮充分研磨。其余方法同 C.2.1。

C.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

C.2.2.1 凝胶制备

聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%。在小烧杯中按顺序加入双蒸水 20.77 mL,30%凝胶储备液 6 mL,10×TBE 缓冲液 3 mL,TEMED 30 μ L,10%过硫酸铵(现配现用)200 μ L,充分混匀后灌胶。然后插入样品梳。待胶完全凝聚后在电泳槽内加入 1×TBE 电极缓冲液,然后轻轻拔掉梳子。

C.2.2.2 预电泳

加样前进行预电泳,电压 150 V,10 min。

C.2.2.3 加样

取 10 μ L 提取的 RNA 样品(被检测样品、阳性样品、阴性样品),按 1:1 的比例加入加样缓冲液。

C.2.2.4 第一向电泳

电极缓冲液为 TBE,电压 150 V。当溴酚蓝移出凝胶板,二甲苯蓝接近胶底部时,停止电泳。

C.2.2.5 第二向电泳

弃去第一向电泳的电极缓冲液,先将 1×TBE 缓冲液加热到 80 $^{\circ}$ C,倒在电泳槽内,保持温度 70 $^{\circ}$ C~75 $^{\circ}$ C,15 min,使核酸完全变性,调转电极方向,电压为 200 V,至二甲苯蓝示踪染料带迁移到胶顶部,停止电泳。

C.2.2.6 固定

将胶先用双蒸水冲洗 3 次,每次 2 min~3 min,然后用固定液固定 60 min。

C.2.2.7 染色

弃去固定液,用双蒸水冲洗 3 次,每次 2 min~3 min,然后加入染色液振荡染色 30 min。

C.2.2.8 显色

弃去染色液,用双蒸水冲洗 3 次,每次 2 min~3 min,将胶转移至显色液中,振荡,直至显出淡褐色条带,弃去显色液,加入 0.75 mol/L 的碳酸钠溶液。

C.3 结果判断

样品经往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,如阴性对照不出现 RNA 环状分子条带,阳性对照出现 RNA 环状分子条带,待测样品实验结果观察到 RNA 环状分子条带,即可判定检测结果为阳性;未观察到 RNA 环状分子条带,即可判定检测结果为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
生物学测定

D.1 嫁接接种

将待测材料嫁接至鳄梨的幼苗上。剔除待测材料(砧木)生长点,用刀片在其子叶下1 cm处向下呈 $20^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 斜切,深度达茎粗三分之二为宜,切口长5 mm~6 mm;接种鳄梨日斑类病毒至鳄梨(*P. Americana*) Hass品种的(接穗)幼苗叶下2 cm处,向上呈 $20^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 斜切,深度为茎粗两分之一左右,切口长为5 mm~6 mm,将接穗与砧木的舌形切口互相嵌接好,并用嫁接夹在切口吻合处加以固定,使切口密切接合,并立即栽植在营养钵中,沿钵边缘浇足底水。

D.2 寄主症状

将待测材料嫁接至鳄梨 Hass品种的幼苗上,2个月到3年后,嫁接苗木的茎干、子叶上显示黄色、橙色或白色的斑纹或斑点,叶片上有时能显示花斑和扭曲的症状。可利用胚胎嫁接或高温($30^{\circ}\text{C}\sim 32^{\circ}\text{C}$)培养方法加快表现症状。
