



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3686—2013

白蜡树黄化植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of *Candidatus Phytoplasma fraxini*

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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、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。

本标准主要起草人：刘鹏、赵文军、廖芳、赵卫东、牛春敬、郭京泽、王金成、李鑫、黄国明。

白蜡树黄化植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了白蜡树黄化植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境白蜡树苗木中白蜡树黄化植原体的检疫鉴定。

2 原理

2.1 分类地位

白蜡树黄化植原体 (*Candidatus Phytoplasma fraxini*, Ash yellows *phytoplasma*), 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*), 16SrⅧ 植原体组。

2.2 鉴定方法

白蜡树黄化植原体的分子生物学特性作为本标准鉴定方法的主要依据。

本标准应用植原体分类鉴定软件 (*iPhyClassifier*), 得到特异性的植原体核糖体 16S rDNA 序列限制性内切酶模拟指纹图谱, 该软件提供的模拟酶切图谱作为鉴定的依据。

3 仪器、用具和试剂

3.1 仪器

PCR 仪、超净工作台、高压灭菌锅、制冰机、台式冷冻离心机、台式小型离心机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统。

3.2 用具

可调移液器 (20 μ L、200 μ L、1 000 μ L) 及相关吸头、研钵、离心管 (2 mL)、PCR 管、量筒、烧杯、酒精灯、镊子等。

3.3 试剂

3.3.1 研磨液

Na_2HPO_4 0.1 mol/L

NaH_2PO_4 0.03 mol/L

EDTA 10 mmol/L (pH 8.0)

蔗糖 10% (质量浓度)

聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)-40 2% (质量浓度)

调整 pH 至 7.6, 然后过滤除菌。

使用前加入 0.15% (质量浓度) 牛血清白蛋白 (BSA) 和 1 mmol/L 维生素 C。

3.3.2 CTAB 缓冲液

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

3.3.3 其他试剂

苯酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇、琼脂糖、溴化乙锭、PCR 缓冲液、*Taq* DNA 聚合酶、引物等。

4 检测鉴定方法

4.1 症状观察

现场对白蜡树苗木进行观察,症状描述参见附录 A,挑取可疑症状植株样品带回实验室检测。

4.2 植原体 DNA 提取方法

取 0.3 g 组织(树根韧皮部组织,可选取叶脉和叶柄)放于研钵中,加入 3 mL 预冷研磨液并研磨,将粗汁液转移至 2 mL 离心管中,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,在 750 μ L 预热(55 ℃)CTAB 缓冲液中悬浮沉淀,55 ℃下孵育 30 min,间歇颠倒混匀,离心管在冰上冷却 30 s,加入 750 μ L 三氯甲烷:异戊醇(24:1 体积比),涡旋振荡,4 ℃或室温下 13 000 r/min 离心 4 min。小心将上面水相转至一个新的 1.5 mL 离心管中,加入 1 体积预冷异丙醇,涡旋振荡,冰上孵育 4 min 后 4 ℃或室温下 13 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液,用 500 μ L 70%(体积分数)冷乙醇洗涤 DNA 沉淀,4 ℃或室温下 13 000 r/min 离心 1 min,干燥 DNA 沉淀,用 20 μ L 灭菌蒸馏水悬浮沉淀,55 ℃下孵育离心管 10 min 有助于 DNA 再悬浮,-20 ℃短期贮存或-80 ℃长期贮存。

注:植原体基因组 DNA 提取方法也可采用商品试剂盒提取。

4.3 通用引物 PCR 扩增及序列测定

用 2 对通用引物进行巢式 PCR 反应及凝胶电泳检测,扩增植原体 16S rDNA 序列,方法见附录 B。

4.4 序列分析鉴定

将第二轮 PCR 产物(引物 R16fn/R16rn)进行序列测定,序列与 Genbank 上已知的白蜡树黄化植原体序列进行比对。

4.5 RFLP 分析

应用软件(*iPhyClassifier*)对植原体 16S rDNA 序列进行分析,软件原理为以 17 种限制性内切酶 *Alu* I, *Bam* HI, *Bfa* I, *Bst* UI, *Dra* I, *Eco* RI, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Kpn* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Rsa* I, *Ssp* I, *Taq* I 对白蜡树黄化植原体的 16S rDNA(R16fn/R16rn)进行模拟酶切图谱分析,标准酶切图谱见附录 B。

5 结果判定

对照结果正常,通用引物 R16fn/R16rn 经第二轮 PCR 扩增在 1 250 bp 左右处有条带出现,将其扩增产物测序并与 Genbank 上已知的白蜡树黄化植原体序列进行比对同源性最高;同时进行 RFLP 图谱分析,图谱分析结果与白蜡树黄化植原体标准图谱一致,则判定该植物样品携带白蜡树黄化植原体。

6 样品和资料的保存

6.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出白蜡树黄化植原体的样品应保存于 -20°C 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满应经高压灭菌后方可处理。

6.2 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。

SN/T 3686—2013

附录 A

(资料性附录)

白蜡树黄化植原体生物学特性

A.1 白蜡树黄化植原体

A.1.1 症状

该植原体病害最典型症状为枝梢丛枝,叶片变小,边缘卷曲,颜色变浅绿,后期变黄萎蔫,造成白蜡树等寄主植物生长衰退。树木的各生长阶段均可感病且表现症状,以美国白蜡树(white ash)为例,植原体危害的症状包括:幼苗或小树发育迟缓,韧皮部呈现微黄色,根部坏死,严重的在树木发育早期就会枯黄死亡。在病害晚期,靠近树干基部上有幼嫩枝条生长。随着树龄的增长对植原体病害的抵抗能力会逐渐增强。

A.1.2 寄主范围

白蜡树是主要寄主,包括白蜡树属(*Fraxinus*)的约 12 个种,其中以美国白蜡树(white ash)和 downy ash 较易感病。在自然条件下,部分丁香属(*syringae*)的植物也是白蜡树植原体的寄主,包括 *Syringa josikaea* (hungarian lilac), *Syringa julianae*, *Syringa oblata*, *Syringa persica* (lilac), *Syringa villosa* (late lilac), *Syringa vulgaris* (lilac) 等。接种寄主包括胡萝卜、红三叶草、长春花等。

A.1.3 传播途径

据文献记载,目前认为白蜡树黄化植原体最早在北美中部地区被发现并传播。近距离传播主要由取食植株韧皮部的介体昆虫传播,如叶蝉(*Fieberiella florii*)等;白蜡树属和丁香属苗木的移栽调运可以使植原体病原远距离传播。据研究,该植原体不随种子或幼苗传播。

A.1.4 地理分布

美国(科罗拉多州、康涅狄格州、伊利伊诺州、印地安那州、爱荷华州、堪萨斯州、肯塔基州、马萨诸塞州、密歇根州、明尼苏达州、密苏里州、蒙大拿州、内布拉斯加州、新罕布什尔州、新泽西州、纽约州、北达科他州、俄亥俄州、宾夕法尼亚州、南达科他州、犹他州、佛蒙特州、西弗吉尼亚州、威斯康星州、怀俄明州)、加拿大(阿尔伯塔省、曼尼托巴省、安大略省、魁北克省、萨斯喀彻温省)。

A.1.5 分子生物学特性

植原体基因组包括染色体与染色体外(质粒)两部分,遗传物质为 dsDNA,分子量约为 5×10^8 道尔顿。此外,植原体基因组 DNA 中,G+C 含量较低,为 23%~29.5%,A+T 含量较丰富。16S rDNA 基因是原核生物的高度保守序列,在植原体及其他支原体原核生物的分类研究中,它常作为系统分类比较的主要特征。

附 录 B
(规范性附录)
通用引物 PCR 扩增和 RFLP 指纹图谱

B.1 引物序列

引物序列见表 B.1。

表 B.1 引物序列表		
	引物名称	引物序列 5'-3'
通用引物	R16mF	CAT GCA AGT CGA ACG GA
	R16mR	CTT AAC CCC AAT CAT CAA C
	R16fn	ACA GTT GCT AAG ACT GG
	R16rn	GCG GTG TGT AC A AAC CCC G

B.2 PCR 反应体系及参数

B.2.1 PCR 反应体系见表 B.2。

表 B.2 PCR 反应体系表	
试剂名称	加样量/μL
10×PCR 缓冲液	3.0
10 mmol/L dNTP	0.6
5 μmol/L 上游引物	1.0
5 μmol/L 下游引物	1.0
5 U/μL Taq DNA 聚合酶	0.4
10 ng/μL 模板 DNA	2.0
双蒸水	22.0
注：DNA 模板的取量应根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节；根据 DNA 模板的取量补充双蒸水至 30.0 μL。	

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：以携带有白蜡树黄化植原体 16S rDNA 序列的质粒或 DNA 为模板。
- PCR 反应的空白对照：以无菌蒸馏水代替 DNA 模板。

B.2.3 PCR 的反应条件

应用引物 R16mF/R16mR 进行第 1 轮 PCR。反应条件为：94 ℃/5 min；94 ℃/30 s，53 ℃/30 s，72 ℃/1 min，35 个循环；72 ℃/10 min。反应体系见表 B.2。
第 1 轮 PCR 产物用灭菌双蒸水 1：50(体积比)稀释，取 1 μL 为模板应用通用引物 R16fn/R16rn

SN/T 3686—2013

进行第 2 轮 PCR 反应。R16fn/R16rn 反应条件为:94 ℃/5 min;94 ℃/30 s,60 ℃/30 s,72 ℃/1 min,35 个循环;72 ℃/10 min。反应体系见表 B.2。

不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

B.3 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5% 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.4 白蜡树黄化植原体 RFLP 指纹图谱

白蜡树黄化植原体 RFLP 指纹图谱见图 B。

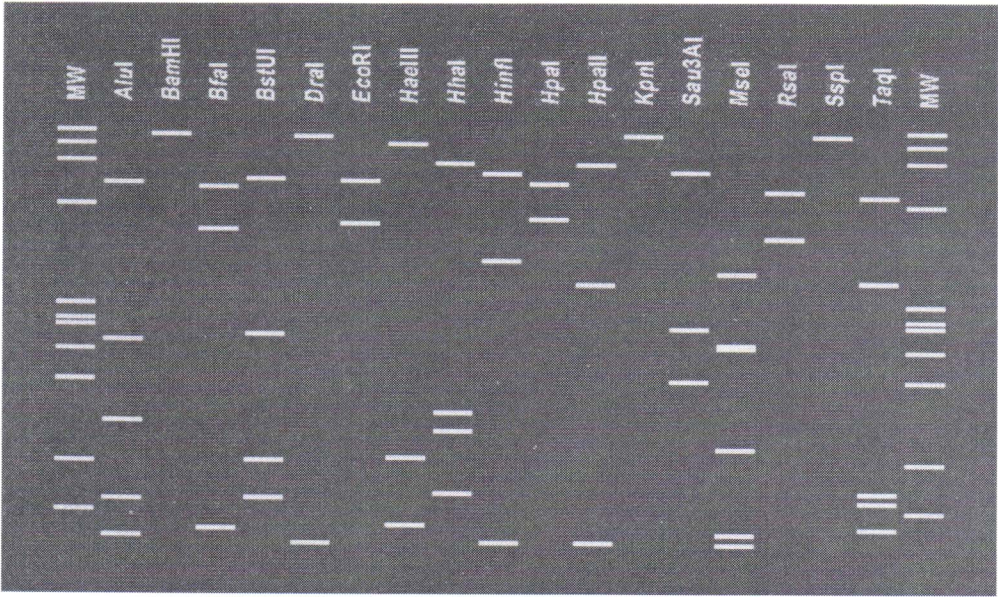


图 B 白蜡树黄化植原体 RFLP 指纹图谱