



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3960—2014

蓝莓矮化植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of Blueberry stunt phytoplasma

2014-04-09 发布

2014-11-01 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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：李鑫、林长军、王有福、姜一、曹冬梅、胡强、刘卉秋、王秀芬、徐凤敏、牟海青。

蓝莓矮化植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了蓝莓矮化植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境蓝莓树苗木及蓝莓产品中蓝莓矮化植原体的检疫和鉴定。

2 蓝莓矮化植原体基本信息

英文名: Blueberry stunt phytoplasma

分类地位: 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*), 16S r I 植原体组 D 亚组。

蓝莓矮化植原体的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

蓝莓矮化植原体生物学特性和基因特性作为本标准鉴定方法的主要依据。

DAPI 染色后的形态学观察为初步筛查方法; 以植原体核糖体 16S rDNA 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 仪器用具和主要试剂

4.1 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、涡旋振荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统、荧光显微镜、透射电子显微镜、超薄切片机等。

4.2 用具

移液器、研钵、离心管、PCR 管、量筒、烧杯、酒精灯、镊子等。

4.3 主要试剂

4.3.1 CTAB 缓冲液

CTAB	20 g/L
Tris-HCl	100 mmol/L (pH 8.0)
EDTA	20 mmol/L (pH 8.0)
NaCl	1.4 mol/L
PVP-40	10 g/L

4.3.2 PBS 缓冲液 (0.2 mol/L pH 7.4)

无水 NaH_2PO_4 24 g

NaOH 4.9 g
加水定容至 1 000 mL。

4.3.3 其他试剂

DAPI、巴比妥钠、乙酸钠、2% 钼酸水溶液、戊二醛、0.1 mol/L 盐酸苯酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇、琼脂糖、Goldview 核酸染料、PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物等。

5 检测鉴定方法

5.1 症状观察

5.1.1 现场查验

现场对蓝莓苗木进行观察,症状描述参见附录 A,选取可疑症状植株样品和随机样品带回实验室检测。

5.1.2 DAPI 染色

选取幼嫩组织(新叶叶梗、枝梢、茎秆及根部韧皮部组织),切片,用 1 μg/mL DAPI 溶液(4',6-二脒基-2-苯基咪唑)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,故每个样品应选取不同部位的幼嫩材料进行检测。

5.1.3 透射电镜观察

将采集的样品制备超薄切片,通过电子显微镜观察植物韧皮部是否存在植原体粒体。具体方法见附录 B。

5.2 DNA 提取

处理样品的方法主要为植物组织中植原体基因组 DNA 提取方法。

取 0.1 g 样品置于预冷的研钵中,在液氮中将样品研磨成粉末状,并迅速转入 1.5 mL 的离心管中。加入 800 μL 65 ℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液,涡旋振荡充分混匀,65 ℃ 水浴 50 min,每隔 10 min 轻轻颠倒混匀一次。冷却至室温,加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1),轻轻颠倒混匀,静置 10 min,4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,重复一次。加入等体积异丙醇或 2 倍体积预冷的无水乙醇,轻轻颠倒混匀,出现 DNA 絮状沉淀,在冰上放置 30 min 沉淀 DNA,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,离心管倒置滤纸上干燥,用 800 μL 70% 冰乙醇清洗沉淀两次,以除去盐离子等。加入 800 μL 70% 冰乙醇后,轻轻颠倒离心管几次,将沉淀于底部的 DNA 弹起,放置离心管 10 min,4 ℃ 10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,重复一次,风干去除乙醇。可重复上述步骤一次。最后在沉淀中加入 200 μL TE 溶解 DNA 沉淀,-20 ℃ 保存备用。

植原体基因组 DNA 提取方法也可采用商品化试剂盒提取。

5.3 通用引物 PCR 扩增及序列测定

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

5.4 序列分析鉴定

将第二轮 PCR 产物(引物 P1A/16S-SR,产物大小为 1 525 bp)进行序列测定,在 Genbank 中进行序列比对。

5.5 RFLP 分析

应用软件(*iPhyClassifier*)对植原体 16S rDNA 序列进行分析。分析图谱见附录 D。

6 结果判定

6.1 形态学鉴定

表现症状与 A.1 描述一致且 5.1.2 检测实验中 DAPI 染色观察结果显示蓝色荧光,或 5.1.3 中通过电子显微镜观察,发现韧皮部筛管中含有直径为 $500\ \mu\text{m}\sim 1\ 000\ \mu\text{m}$ 的圆形、椭圆形、不规则形状等的菌原体,可初步判定为植原体。

6.2 分子生物学鉴定

在 5.5 中,若巢氏 PCR 扩增后的序列经 17 种限制性内切酶酶切后与附录 D 中图谱一致,可判定该样品携带蓝莓矮化植原体。

7 样品保存与复核

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。对检出蓝莓矮化植原体的样品应保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满 6 个月后,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照片,并附 DNA 测序原始图谱及限制性内切酶指纹图谱。

附 录 A
(资料性附录)
蓝莓矮化植原体资料

A.1 表现症状

该病原物可侵染蓝莓,感病植株症状因生长时期、染病树龄及品种而异。染病植株可发生矮化、节间变短、丛枝及活力下降等症状,在6月中旬和9月下旬表现明显。小而向下卷曲的叶片沿着叶边缘和侧脉间变黄,呈黄绿斑驳状,这些斑驳区域在晚秋时过早地变成鲜红色,但中脉仍为深蓝绿色。结果少而硬、口味不佳、成熟晚,较健康果实附着树丛时间更长。

A.2 寄主范围

该病原物寄主范围广泛,蓝莓树是主要的寄主。还可侵染草莓(*Fragaria ananassa*)、洋葱(*Allium cepa* Linn)、芹菜(*Apium graveolens*)、油菜(*Brassica campestris* L.)、甘蓝(*Brassica oleracea* Bail.)、胡萝卜(*Daucus carota*)等。

A.3 传播途径

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 flori*)等;种苗的调运可以使植原体进行远距离传播。

A.4 地理分布

在欧洲、北美、亚洲、墨西哥和巴西等地都有分布。

附 录 B
(规范性附录)
电子显微观察

B.1 试剂试材**B.1.1 锇酸固定液**

巴比妥-乙酸缓冲液的 1% 锇酸固定液的配制如下:

巴比妥钠	2.89 g
乙酸钠	1.15 g
加双蒸馏水至 100 mL 形成溶液①。	
2% 锇酸水溶液	12.5 mL
溶液①	5.0 mL
0.1 mol/L 盐酸	5.0 mL

加双蒸馏水至 25.0 mL, 混合后用 0.1 mol/L 盐酸调节 pH 至 7.2, 即为 1% 锇酸固定液, 在冰箱保存备用。

B.1.2 戊二醛固定液

一般为 25% 戊二醛水溶液。可在除巴比妥以外的任何缓冲液中使用, 终浓度为 25%。

B.1.3 环氧树脂

Epon812	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 Epon812 倒入烧杯中, 置 80℃ 温箱融化备用。按上述比例, 顺序加入顺丁烯二酸酐, 充分搅拌, 待溶化呈透明, 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, 再将玻璃倾斜浸入蒸馏水中, 薄膜即从玻璃上脱落下来漂浮于水面, 取干净的铜网摆上, 压紧, 在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**

选取呈现症状的叶片或者幼嫩茎, 用刀片切取叶脉、叶柄或者幼嫩枝条, 大小为 3 mm²。取健康叶片作为阴性对照。

SN/T 3960—2014

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 3 次。然后用 1% 锇酸后固定 2 h, PBS 清洗 3 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。

B.2.4 渗透

脱水后的组织块在丙酮/树脂(1:1)中渗透 3 d, 再在全树脂中渗透 24 h。

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 °C 下 24 h, 45 °C 下 24 h, 60 °C 下 24 h。

B.2.6 切片

在超薄切片机上将固化的组织块作切片。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, 将乙酸双氧铀染色滴入蜡盘上。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滴上, 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, 观察韧皮部筛管中是否含有直径为 500 μm~1 000 μm 的圆形、椭圆形、不规则形状等的菌原体, 若有可初步判定为植原体。

附 录 C
(规范性附录)
PCR 凝胶电泳检测

C.1 引物序列(见表 C.1)

表 C.1 引物序列

反应	引物名称	引物序列 5'-3'	扩增产物长度
第一轮 PCR	P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	1 800 bp 左右
	P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	
第二轮 PCR	P1A 16S-SR	AAC GCT GGC GGC GCG CCT AAT AC GGT CTG TCA AAA CTG AAG ATG	1 525 bp

C.2 PCR 反应体系及参数

C.2.1 PCR 反应体系(见表 C.2)

表 C.2 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/μL
10×PCR 缓冲液	2.5
2.5 mmol/L dNTP	2.0
10 μmol/L 上游引物	2.0
10 μmol/L 下游引物	2.0
5U/μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.2
10 ng/μL 模板 DNA	2.0
双蒸水	14.3
总体积	25.0

注：DNA 模板的取量应根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节；第一轮与第二轮 PCR 均采用此体系。

C.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照：以健康的叶片 DNA 为模板；
阳性对照：以携带有蓝莓矮化植原体 16S rDNA 序列的质粒或 DNA 为模板；
PCR 反应的空白对照：以灭菌去离子水代替 DNA 模板。

C.2.3 PCR 的反应条件

用引物 P1/P7 进行第一轮 PCR。反应条件为：95 ℃/8 min；95 ℃/60 s，55 ℃/60 s，72 ℃/90 s，