



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3448—2012

桃树黄化植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of peach yellows phytoplasma

2012-12-12 发布

2013-07-01 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、中华人民共和国宁夏出入境检验检疫局、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：牟海青、陈林、李萍、杨毅、赵文军、朱水芳、王有福。

桃树黄化植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了桃树黄化植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境桃树苗木及接穗中桃树黄化植原体的检疫和鉴定。

2 原理

2.1 基本信息

桃树黄化植原体(peach yellows phytoplasma),软壁菌门(Tenericutes),柔膜菌纲(Mollicutes),菌原体目(Mycoplasmatales),非醇原体科(Acholeplasmataceae),植原体候选属(*candidatus* phytoplasma),16 Sr I 植原体组。

2.2 方法原理

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 作为一种初步筛选植原体的方法;PCR 技术灵敏度高、特异性好,RFLP 技术目前是国际上植原体鉴定分类的主要方法,在本标准中 PCR 技术与 RFLP 技术结合作为鉴定桃树黄化植原体的最终方法。

3 器材和试剂

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、冰箱、旋涡振荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统、荧光显微镜、电子显微镜。

DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)、PCR 缓冲液、 $MgCl_2$ 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物等。

4 检测鉴定方法

4.1 症状观察

仔细观察桃树种苗、叶片等,症状描述参见附录 A 的 A.1。

4.2 DAPI 染色

选取幼嫩组织(新叶叶梗,枝梢,茎杆及根部韧皮部组织),切片,用 $1 \mu g/mL$ 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,故每个样品需选取不同部位的幼嫩材料进行检测。

4.3 电子显微镜观察

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。方法参见附录 B。

4.4 通用引物 PCR、电泳检测、产物测序并比对分析

发病植物样品总 DNA 提取方法参见附录 C,通用引物 PCR 凝胶电泳并测序(见附录 D)。

4.5 RFLP 图谱检测

见附录 E。

5 结果判定

5.1 表现症状与 A.1 描述一致且 4.2 检测实验中 DAPI 染色观察结果显示蓝色荧光,可初步判定可能为桃树黄化植原体,但需通过 4.4、4.5 方案进一步检测。

5.2 在 4.3 检测中,若通过电子显微镜观察,发现桃树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,则可初步判定可能为桃树黄化植原体,但需要 4.4、4.5 方案的进一步检测。

5.3 在 4.4 检测中,若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,可初步判定为桃树黄化植原体,经序列测定并比对后,若与 D.4 中序列同源性大于 97.5%,则可用 4.5 检测方法进一步确认。

5.4 在 4.5 检测中,若经通用引物扩增所得序列经 17 种限制性内切酶酶切后与图 E.1 一致可判定该样品携带桃树黄化植原体。

6 样品保存与复核

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。对检出桃树黄化植原体的样品应保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后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。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片。

6.3 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)
植原体生物学特性

A.1 症状

主要对桃树叶片以及果实进行症状观察。该植原体病害最典型症状为叶片黄化,果实较小、植株长势衰退、提前落叶。

A.2 寄主范围

桃树是主要的寄主,包括碧桃(*Prunus persica*)、毛桃(*Amygdalus persica*)等。

A.3 传播途径

主要由取食植株韧皮部的介体昆虫传播,如叶蝉(*Fieberiella florii*)、蚜虫(*Aphidae*)等;感病桃树种苗、接穗等调运可以使植原体病原远距离传播。桃植株之间的嫁接可以传播桃黄化病,另外,嫁接能够将植原体从桃树传到长春花上。

A.4 地理分布

北京、四川等,其他国家无报道。

附 录 B
(资料性附录)
电子显微镜观察

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

① 溶液

巴比妥钠($C_8H_{11}N_2O_3Na$) 2.89 g

乙酸钠(CH_3COONa) 1.15 g

加双蒸馏水至 100 mL

② 溶液

取 2% 锇酸水溶液 12.5 mL

① 溶液 5.0 mL

0.1 mol/L 盐酸(HCl) 5.0 mL

加双蒸馏水至 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。

B.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%。

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 DDSA, 充分搅拌, 待熔化呈透明, 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**

选取呈现症状的桃树叶片或者幼嫩茎, 用刀片切取叶脉、叶柄或者幼嫩枝条, 大小为 3 mm²。取健

康桃树叶片作为阴性对照。

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) 清洗三次。然后用 1% 锇酸后固定 2 h, PBS 清洗三次。

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 1 d。

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, 如图 B.1。

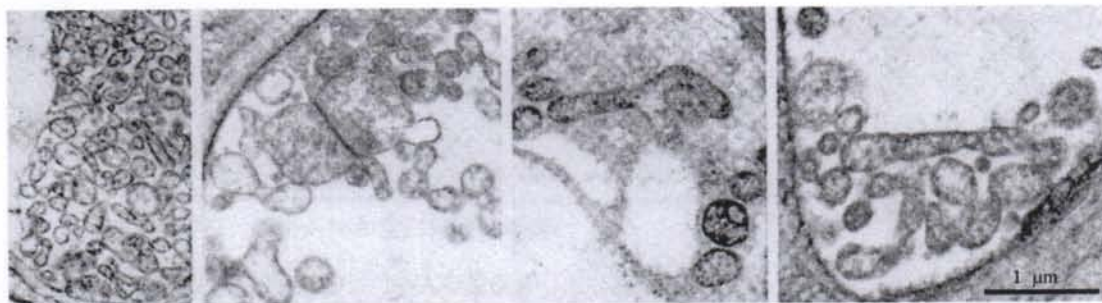


图 B.1 植原体形态(引自 Bertaccini, 2007)

SN/T 3448—2012

附 录 C
(资料性附录)
植原体 DNA 的提取

C.1 植原体细胞的富集**C.1.1 溶液配制**

植原体细胞富集缓冲液(100 mL):无水 K_2HPO_4 1.67 g, KH_2PO_4 0.41 g,蔗糖 10 g,牛血清白蛋白 0.15 g,PVP-10 2 g,维生素 C 0.53 g,用 5 mol/L 的 KOH 调节 pH 值至 7.6。

C.1.2 植原体细胞的富集方法

称取新鲜样品叶中脉 1.5 g,加入 7 mL~8 mL 新制备的富集缓冲液,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,并不定期的摇动。

C.2 DNA 提取**C.2.1 溶液配制**

DNA 提取缓冲液:2% CTAB(50 ℃左右溶解),1.4 mol/L NaCl,20 mmol/L EDTA,100 mmol/L Tris-HCl pH8。

C.2.2 DNA 提取方法

将 1 mL 富集样品转移至 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 000g,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 000g 的条件下,离心 5 min;将上清液转入新管,加入 800 μ L 预冷的异丙醇,15 000g 条件下,离心 10 min;弃上清液,加入 500 μ L 的 70%乙醇,在 15 000g 的条件下,离心 5 min;弃掉上清液,干燥沉淀,加入 100 μ L 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 1 年。

附 录 D
(规范性附录)
通用引物 PCR 检测

D.1 引物序列

植原体通用引物:

R16F2n: 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2: 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3

D.2 PCR 反应体系及参数**D.2.1 PCR 反应体系**

见表 D.1。

表 D.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	0.1 mmol/L
正向引物	0.5 μmol/L
反向引物	0.5 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	0.2 U
DNA 模板	5 μL
补 H ₂ O 至	40 μL
注: DNA 模板的取量应根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节。	

D.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照: 以健康的桃树叶片 DNA 为模板。

阳性对照: 以携带有桃树黄化植原体 16S rDNA 序列的质粒为模板。

PCR 反应的空白对照: 以水代替 DNA 模板。

D.2.3 PCR 的反应参数

R16F2n/R16R2: 94 °C/2 min; 94 °C/1 min, 60 °C/30 S, 72 °C/1 min, 35 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.3 琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶, 以 DNA Marker 作为相对分子质量标记, 进行电泳分析, 电泳结束后在凝

胶成像仪观察并记录结果。

D.4 序列测定

序列如下：

5'-GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAA
GACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTA
AAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGAC
TGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAA
CTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTA
GGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACT
ATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGGGTGCGTAGGCGGTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGC
TATAAAAACCTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAA
ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACG
CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTACTAAACGTTGGTTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCC
TGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGT
GGATCATGTTGTTTAATTGGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGC
AAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACC
AGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGA
CGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTAC
AAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATT
GAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGC
CGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA-3'

D.5 结果判断

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳可以对检测结果进行初步鉴定,引物 R16F2n/R16R2 扩增 1.24 kb 左右大小的条带。R16F2n/R16R2 引物扩增产物经克隆后测序获得 D.4 序列,则判定结果为阳性。通过测得 16S rDNA 序列的方法鉴定植原体,需要测得的 DNA 序列至少为 1.24 kb 左右,即 R16F2n/R16R2 引物扩增的片段长度。

附 录 E

(规范性附录)

RFLP 指纹图谱分析

E.1 引物序列

R16F2n:5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2:5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

E.2 PCR 反应体系

同 D.2.1。

E.3 PCR 的反应参数

同 D.2.3。

注：不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

E.4 RFLP 分析

将 D.4 中大小为 1 246 bp 的 16S rDNA 序列输入模拟 RFLP *iPhyClassifier* 软件(<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>),经 17 种限制性内切酶(*Alu* I、*Bam*H I、*Bfa* I、*Bst* U I、*Dra* I、*Eco*R I、*Hae* III、*Hha* I、*Hinf* I、*Hpa* I、*Hpa* II、*Kpn* I、*Mbo* I、*Mse* I、*Rsa* I、*Ssp* I、*Taq* I)酶切后 RFLP 图谱如图 E.1。

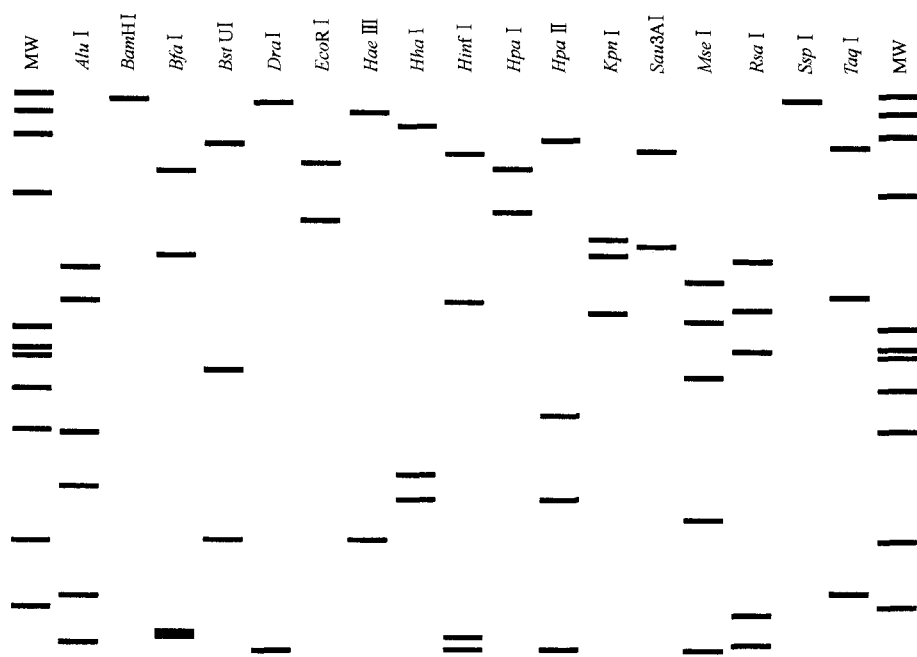


图 E.1 桃树黄化植原体 16S rDNA 序列 RFLP 模式图