



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3711—2013

桉树黄化植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of alder yellows phytoplasma

2013-11-06 发布

2014-06-01 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、中国农业大学。

本标准主要起草人：冯建军、牟海青、郑耘、赵文军、龙海、王红英、罗来鑫、李健强、章桂明。

桉树黄化植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了桉树黄化植原体的检测鉴定方法。

本标准适用于桉树苗木等繁殖材料或产品中桉树黄化植原体的检疫和鉴定。

2 桉树黄化植原体基本信息

英文名:Alder yellows 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(*Candidatus* Phytoplasma),桉树黄化植原体群 A 亚组(16SrV-A)。

远距离传播主要途径为带菌苗木。

桉树黄花植原体近似种主要包括桉树黄花植原体群 A 亚组(16SrV-A)的其他三种植原体,即桉树黄花植原体、桉树丛枝植原体、悬钩子矮化植原体。

其他背景资料参见附录 A。

3 方法原理

桉树黄化植原体的寄主范围、症状特点、16S rDNA 序列及其 RFLP 指纹图谱分析等方法是检测鉴定该植原体的主要依据。

4 仪器、用具及试剂

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、旋涡振荡器、电泳仪和凝胶成像系统。

4.2 用具

可调移液器(最大量程为 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、酒精灯和镊子等。

4.3 试剂

具体试剂见附录 B 和附录 C。

5 检测鉴定方法

5.1 症状观察

现场对桉树苗木进行症状观察,症状描述参见附录 A 中 A.3,挑取可疑症状植株样品带回实验室

检测。

5.2 样品 DNA 提取

具体步骤见附录 B 中 B.3。

5.3 通用引物 PCR 扩增

利用两对通用引物通过巢式 PCR 扩增植原体 16S rDNA,方法见附录 C。

5.4 PCR 产物的克隆与测序分析

将 PCR 产物进行克隆测序,将所得 DNA 序列输入 GenBank 进行 BLAST 比对检索,采用生物信息学软件对所得到的 DNA 序列与 GenBank 中其他相关植原体序列进行比较和分析,并构建系统发育树。

5.5 PCR 产物的序列虚拟 RFLP 分析

利用 *iPhyClassifier* 在线软件(<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cg>)或 DNA-FP Cluster 软件,分别用限制性内切酶 *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI* 对样品 16S rDNA(R16F2n/R16R2)扩增产物序列进行虚拟 RFLP 酶切,其图谱与桉树黄化植原体标准酶切图谱(见附录 D.2)比对分析。

6 结果判定

当待检测样品的症状与描述相一致(或样品无显症),其植原体 16S rDNA 巢式 PCR 扩增产物具有约 1248 bp 的片段,且序列 RFLP 图谱分析结果与桉树黄化植原体模拟标准图谱一致,可判定该植物样品携带桉树黄化植原体。

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。对检出桉树黄化植原体的样品应保存于一20℃冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后须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图。

附 录 A
(资料性附录)
桤树黄化植原体相关资料

A.1 英文名

Alder yellows phytoplasma

A.2 中文名

桤树黄化植原体

A.3 为害症状

该植原体病害最典型症状为树木叶片稀疏、发黄、变小(见图 A.1),严重时死亡。树木的各生长阶段均可感病,但有时无明显症状。



图 A.1 桤树黄化植原体为害症状

A.4 寄主范围

主要寄主是桤木属,包括粘胶桤木(*Alnus glutinosa*)、红桤木(*Alnus rubra*)等树种。在自然条件下,长春花(*Catharanthus roseus*)也是桤树黄化植原体的寄主。

A.5 传播途径

桤树黄化植原体近距离传播主要由取食植株韧皮部的介体昆虫传播,如桤树广头叶蝉(*Oncopsisalni*)等;桤木属苗木的移栽调运可以使植原体病原远距离传播。

A.6 分布

法国、德国、瑞士、奥地利、意大利、塞尔维亚以及波罗的海地区。

附 录 B
(规范性附录)
植原体 DNA 提取

B.1 试剂

十二烷基肌氨酸钠(*N*-Lauroylsarcosine sodium salt, NLS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、牛血清蛋白(BSA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸(HCl)、氯化钠(NaCl)、苯酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇和乙醇等。

B.2 溶液

B.2.1 研磨液

K_2HPO_4 : 21.7 g;
 KH_2PO_4 : 4.1 g;
蔗糖: 100 g;
BSA: 1.5 g;
PVP-10: 20 g;
加水至 1 000 mL, 过滤除菌备用。

B.2.2 DNA 抽提液

CTAB: 20 g/L;
Tris-HCl: 100 mmol/L (pH 值为 8.0);
EDTA: 20 mmol/L (pH 值为 8.0);
NaCl: 1.4 mol/L。

B.2.3 TE 缓冲液

Tris: 10 mmol/L;
EDTA: 1 mmol/L (pH 值为 8.0)。

B.2.4 CTAB/NaCl 溶液

CTAB: 10%;
NaCl: 0.7 mol/L。

B.2.5 蛋白酶 K

蛋白酶 K: 20 mg;
无菌水: 1 mL;
37 °C 水浴 1 h 后分装成单次使用的小份, 于 -20 °C 备用。

B.3 样品 DNA 提取

取 0.1 g~0.5 g 样品组织(韧皮部组织或者叶脉和叶柄)于研钵中,加入适量液氮研磨,1 mL 研磨液,4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,加入 500 μ L DNA 提取液、20 μ L 蛋白酶 K、80 μ L 10% NLS,55 ℃水浴 1 h~2 h,然后 4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min;取上清液,400 μ L 异丙醇,-20 ℃保持 30 min 后,4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,加入 600 μ L TE 缓冲液、30 μ L 10% SDS、12 μ L 蛋白酶 K,37 ℃温育 30 min~60 min;加 100 μ L 5 mol/L NaCl 混匀,84 μ L CTAB/NaCl 在 65 ℃水浴 10 min;加等体积三氯甲烷/异戊醇,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液,再加等体积苯酚/三氯甲烷/异戊醇抽提,8 000 r/min 离心 5 min;取上清液,加 2 倍体积无水乙醇于-20 ℃沉淀核酸,4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min;弃上清液,加 500 μ L 70%乙醇洗涤,4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,真空干燥 DNA,加适量 TE 悬浮,-20 ℃短期贮存或-80 ℃长期贮存备用。

植原体基因组 DNA 提取方法也可采用商品试剂盒提取。



SN/T 3711—2013

附 录 C
(规范性附录)
通用引物 PCR 扩增

C.1 引物序列

引物序列见表 C.1。

表 C.1 引物序列

通用引物	引物名称	引物序列 5'-3'	扩增产物长度
	R16mF2 R16mR1	CAT GCA AGT CGA ACG GA CTT AAC CCC AAT CAT CGA C	1 432 bp
	R16F2n R16R2	GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	1 248 bp

C.2 PCR 反应体系及参数**C.2.1 PCR 反应体系**

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 \times PCR 缓冲液	5.0
2.5 mmol/L dNTP	4.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	1.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	1.0
5 U/ μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.4
10 ng/ μL 模板 DNA	2.0
加双蒸水至	50
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：以健康的叶片 DNA 为模板。

C.2.2.2 阳性对照：以携带有桉树黄化植原体 16S rDNA 序列的质粒或 DNA 为模板。

C.2.2.3 PCR 反应的空白对照：以无菌蒸馏水代替 DNA 模板。

C.2.3 PCR 的反应条件

用引物 R16mF2/R16m R1 进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C/5 min; 94 °C/1 min, 60 °C/2 min, 72 °C/3 min, 35 个循环; 72 °C/10 min。

将 PCR 扩增产物用灭菌双蒸水 1 : 100(体积比)稀释为模板, 用通用引物 R16F2n/R16R2 进行巢氏 PCR 扩增, 反应体系见 B.2.1。反应条件为: 94 °C/5 min; 94 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/3 min, 35 个循环; 72 °C/10 min。

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 DL2000 作为分子量标记, 进行电泳分析, 电泳结束后在凝胶成像仪观察并记录结果。

附录 D (规范性附录)

16S rDNA 序列及 RFLP 分析

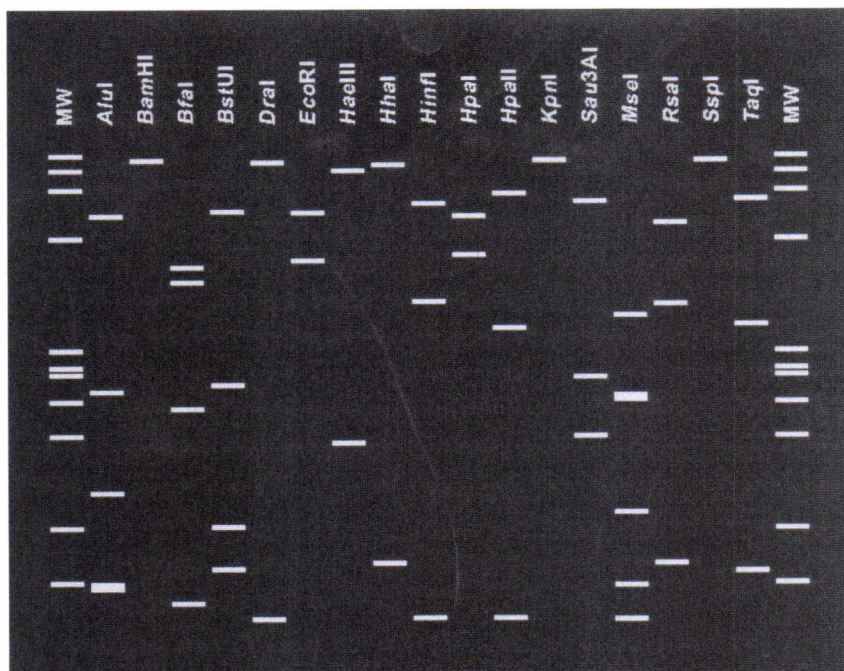
D.1 桉树黄化植原体 16S rDNA 序列

通过巢氏 PCR 扩增并测序,桉树黄化植原体 16S rDNA(R16F2n/R16R2)序列如下。

1	GAAACGGTTG	CTAAGACTGG	ATAGGAAACA	GAAAGGCATC	TTTTTGTTT	TAAAAGACCT
61	TCTTCGGAGG	GTATGCTTAA	AGAGGGGCTT	GCGCCACATT	AGTTAGTTGG	TGAGGTAAAG
121	GCTTACCAAG	ATTATGATGT	GTAGCTGGAC	TGAGAGGTTG	AACAGCCACA	TTGGGACTGA
181	GACACGGCCC	AAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	TTTCGGCAAT	GGAGGAAACT
241	CTGACCGAGC	GACGCCGCGT	GAACGATGAA	GTATTTTCGGT	ATGTAAAGTT	CTTTTATTGA
301	AGAAGAAAAA	ATAGTGAAAA	AACATATCTG	ACGTTATTCA	ATGAATAAGC	CCCGGCTAAC
361	TATGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AAGACATAGG	GGGCGAGCGT	TATCCGGAAT	TATTGGGCGT
421	AAAGGGTGCG	TAGGCAGTTA	GATAAGTCTA	TAATTTAATT	TCAGTGCTTA	ACGCTGTCTT
481	GTTATAGAAA	CTGTCTTGAC	TAGAGTGAGA	TAGAGGCAAG	CGGAATTCCA	TGTGTAGCGG
541	TAAAATGTGT	AAATATATGG	AGGAACACCA	GAAGCGTAGG	CGGCTTGCTG	GGTCTTTACT
601	GACGCTGAGG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAG	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCT
661	GTAAACGATG	AGTACTAAGT	GTCGGGGTAA	CTCGGTACTG	AAGTTAACAC	ATTAAGTACT
721	CCGCCTGAGT	AGTACGTACG	CAAGTATGAA	ACTTAAAGGA	ATTGACGGGA	CTCCGCACAA
781	GCGGTGGATC	ATGTTGTTTA	ATTCGAAGAT	ACACGAAAAA	CCTTACCAGG	TCTTGACATA
841	CTCTGCAAAG	CTATAGAAAT	ATAGTGAGAG	TTATCAGGGA	TACAGGTGGT	GCATGGTTGT
901	CGTCAGTTCG	TGTCGTGAGA	TGTTAGGTTA	AGTCCTAAAA	CGAACGCAAC	CCCTGTCGCT
961	AGTTGCCAGC	ACGTAATGGT	GGGGACTTTA	GCGAGACTGC	CAATTAAACA	TTGGAGGAAG
1021	GTGGGGATAA	CGTCAAATCA	TCATGCCCTT	TATGATCTGG	GCTACAAACG	TGATACAATG
1081	GCTATTACAA	AGAGTAGCTG	AAACGCGAGT	TTTTAGCCAA	TCTCAAAAAG	GTAGTCTCAG
1141	TACGGATTGA	AGTCTGCAAC	TCGACTTCAT	GAAGCTGGAA	TCGCTAGTAA	TCGCGAATCA
1201	GCATGTCGCG	GTGAATACGT	TCTCGGGGTT	TGTACACACC	GCCCGTCA	

D.2 桉树黄化植原体 16S rDNA 序列 RFLP 标准酶切图谱

桉树黄花植原体 16S rDNA 序列(R16F2n/R16R2)RFLP 标准酶切图谱见图 D.1



注：通过 *iPhyClassifier* 在线分析软件，对桉树黄花植原体 16S rDNA 序列 (R16F2n/R16R2) 进行虚拟限制性内切酶 *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI* 的酶切分析。

图 D.1 酶切图谱

参 考 文 献

- [1] 朱天生,潘一展,崔延涛,等.榆树黄化病植原体的分子检测与鉴定[J].植物病理学报,2008,38(4):401-406.
- [2] Lee I M, Gundersen-Rindal D E, Davis R E, et al. Revised classificatin scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences[J].International Journal of systematic bacteriology,1998,48:1153-1169.
- [3] The IRPCM phytoplasma/spiroplasma working team-phytoplasma taxonomy group. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wal-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phoem and insects[J].International Journal of systematic and evolutionary microbiology,2004,54:1243-1255.
- [4] Zhao Y, Wei W, Lee I M, et al. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyclassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII)[J].International Journal of systematic and evolutionary microbiology,2009,59:2582-2593.
-