

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1579—2005

---

### 椰子致死黄化植原体检测方法

Determination of coconut lethal yellowing phytoplasma

2005-05-20 发布

2005-12-01 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

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 均为规范性附录。  
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：中华人民共和国海南出入境检验检疫局。  
本标准主要起草人：李伟东、李继勇、张宁。  
本标准为首次发布的出入境检验检疫行业标准。

## 椰子致死黄化植原体检测方法

### 1 范围

本标准规定了植物检疫中椰子致死黄化植原体的检疫检测方法。

本标准适用于植物检疫中棕榈科植物(包括种果、苗木等繁殖材料)椰子致死黄化植原体的检疫检测。

### 2 原理

#### 2.1 椰子致死黄化植原体

学名: Coconut Lethal Yellowing Phytoplasma

缩写: CLYP

分类地位: 原核生物界(Prokaryotes); 软壁菌门(Tenericute); 软球菌纲(Mollicutes); 植原体属(Phytoplasmata)。

#### 2.2 寄主范围

椰子(*Cocos nucifera*)、轮羽椰(*Allagoptera arenaria*)、香桃椰(*Arenga engleri*)、糖棕(*Borassus flabellifer*)、*Arikuryroba schizophylla*、短穗鱼尾葵(*Caryota mitis*)、*Caryotarumphiana*、散尾葵(*Chrysalidocarpus lutescens*)、长柄贝叶棕(*Corypha elata*)、环羽椰(*Dictyosperma album*)、三角椰(*Dypsis decaryi*)、油棕(*Elaeis guineensis*)、*Gaussia attenuata*、卷叶豪威椰(*Howea belmoreana*)、棍棒椰(*Hyophorbe verschaffeltii*)、彩叶棕属(*Latania spp.*)、蒲葵(*Livistona chinensis*)、圆叶蒲葵(*Livistona rotundifolia*)、中东矮棕(*Nannorrhops richiana*)、加那利枣椰(*Phoenix canariensis*)、枣椰(*P. dactylifera*)、非洲枣椰(*P. reclinata*)、岩枣椰(*P. rupicola*)、橙枣椰(*P. sylvestris*)、*Pritchardia affinis*、太平洋棕(*P. pacifica*)、*P. remota*、国王椰(*P. thurstonii*)、*Ravenea hildebrandtii*、棕榈(*Trachycarpus fortunei*)、圣诞椰(*Veitchia merrillii*)、瓦努阿图圣诞椰(*V. montgomervana*)。

#### 2.3 寄主症状

椰子幼树症状: 主要表现为黄叶以及矛叶和心部的坏死。

结果树症状: 成熟前椰果脱落; 开放或未开放的佛焰苞花序坏死; 旗叶先变成黄褐色, 然后由下往上褪绿变黄; 矛叶和心部腐烂; 树冠倒塌; 根系腐烂。

#### 2.4 地理分布

北美洲: 美国(佛罗里达州和得克萨斯州)、墨西哥。

中美洲和加勒比海地区: 开曼群岛、巴哈马、古巴、牙买加、海地、苏里南、多米尼加、伯利兹、洪都拉斯。

非洲: 加纳、多哥、尼日利亚、贝宁、坦桑尼亚、肯尼亚、莫桑比克、喀麦隆、莫桑比克。

#### 2.5 植原体形态特征

椰子致死黄化植原体形态为近球形、椭圆形、圆筒形、念球状、丝状等多种形态, 它们常处于二均分裂状态, 其大小为  $0.42\mu\text{m}\sim 2\mu\text{m}$ , 最长的为念球状可达  $16\mu\text{m}$  以上。

#### 2.6 传播途径

田间主要通过昆虫介体传播, 昆虫介体主要是蜡蝉(*Myndus crudus* Van Duzee)。染病种苗的转运等人为途径使得植原体远距离传播。

#### 2.7 组织病理学特性

受植原体感染的植物材料组织经 DAPI 染色后, 能在显微镜下直接观察到韧皮部筛管细胞中植原

体特异的 DNA 荧光光点。

## 2.8 分子生物学特性

以染色体 DNA 为基础的分子生物学技术已用来检测和鉴定植原体。根据 16S rRNA 基因保守序列设计通用引物和植原体椰子致死黄化组 16SrIV 特异性引物,应用 PCR 技术进行检测。

## 3 仪器设备、用具及试剂

### 3.1 仪器设备

PCR 扩增仪、多功能电泳仪、冷冻高速离心机、紫外光透视仪、震荡器、冰箱、水浴锅、透射式电子显微镜、电子分析天平(感量 0.1 mg)、超薄切片机、生物研究显微镜等。

### 3.2 用具

微量可调移液器(0.01  $\mu\text{L}$ ~2  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ )、可调移液器头、刀片、Eppendorf 管、研钵等。

### 3.3 试剂

PCR 检测试剂(见附录 A)、OAPI 检测试剂(见附录 B)、电镜观察试剂(见附录 C)。

## 4 检验方法

### 4.1 症状检查

仔细观察椰子和其他棕榈科植物种苗或结果植株,症状描述见 2.3。

### 4.2 PCR 检测

对采集的植物样品进行 PCR 检测,方法见附录 A。

### 4.3 DAPI 检测

对采集的植物样品进行 DAPI 检测。方法见附录 B。

### 4.4 植原体形态观察

对采集的植物样品制备超薄切片,通过电镜观察植原体形态。方法见附录 C。

## 5 结果判定

样品 DAPI 检测到韧皮部筛管细胞中特有的荧光反应,或电镜超薄切片在韧皮部筛管细胞中存在大量植原体,或 PCR 检测表现为阳性,均可判定供检测的样品存在椰子致死黄化植原体。

## 6 样品保存与复核

### 6.1 样品保存

检测结果表现阳性的植物样品液氮干燥后于 $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存。保存样品做好登记和标记工作。

### 6.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录要包括:样品的来源、种类、时间、实验检测时间、地点、方法和结果,并有实验人员的签字。DAPI 检测荧光结果照片,电镜观察植原体形态特征照片,PCR 检测电泳阳性结果照片。

### 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  
(规范性附录)  
PCR 检测

A.1 试剂

A.1.1 DNA 抽提缓冲液

2% CTAB  
100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0  
20 mmol/L EDTA pH 8.0  
1.4 mol/L 氯化钠  
1% PVP  
1% 巯基乙醇  
加无菌水至 1 L。

A.1.2 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0  
1 mmol/L EDTA pH 8.0  
加无菌水至 1 L。

A.1.3 TAE 缓冲液

40 mmol/L Tris-乙酸  
1 mmol/L EDTA  
加无菌水至 1 L。

A.1.4 6×加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝  
40% 蔗糖水溶液。

A.2 实验步骤

A.2.1 植物材料总核酸提取

A.2.1.1 选取呈现早期症状的椰子矛叶或未开放的佛焰苞花序,并取健康椰子矛叶作对照。将植物材料 3 g 于研钵中加液态氮冷冻后充分研磨。

A.2.1.2 加入 15 mL DNA 提取缓冲液(预热 65℃),在 65℃ 水浴中保温 15 min。

A.2.1.3 加入等体积三氯甲烷:异戊醇(24:1),抽提 30 min。

A.2.1.4 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

A.2.1.5 加入等体积三氯甲烷:异戊醇(24:1),抽提 30 min。

A.2.1.6 6 000 r/min 离心 10 min 后,上清液加入三分之二体积冰冻异丙醇,25℃ 下静置 30 min。

A.2.1.7 12 000 r/min 离心 10 min,沉淀经两次 70% 乙醇洗涤,真空干燥后溶解于 200 μL TE 缓冲液中。

A.2.1.8 按 10 μg/mL,加入 RNA 水解酶,于 37℃ 静置 60 min~120 min 后 12 000 r/min 离心 10 min,沉淀经两次 70% 乙醇洗涤。

A.2.1.9 真空干燥后溶解于 200 μL TE 缓冲液或 200 μL 无菌水中。

## A. 2. 2 PCR 反应

### A. 2. 2. 1 植原体通用引物

PCR 反应(可按下述方法配制或所购试剂盒的使用说明):反应液为 50  $\mu\text{L}$ ,含有 50 ng 从植物材料提取的 DNA 作为模板,1  $\times$  PCR 缓冲液,植原体通用引物 P1(5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3')/P7(5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3')各 50 ng,dNTPs 各 125  $\mu\text{mol/L}$ ,1U *Taq* DNA 聚合酶,1.5 mmol/L 氯化镁,50  $\mu\text{L}$  矿物油覆盖。以长春花丛枝植原体 DNA 作阳性对照,椰子健康植株总核酸和无菌水为阴性对照。反应条件为预处理 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 min,后 30 个循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ /1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ /1 min,最后于 72 $^{\circ}\text{C}$  保持 10 min。

### A. 2. 2. 2 植原体椰子致死黄化组特异性引物

PCR 产物用无菌水配成 1:40 或 1:100,取 4  $\mu\text{L}$  作为模板,进行巢式 PCR,以植原体椰子致死黄化组特异性引物 LY16Sf(5'-CAT GCA AGT CGA ACG GAA ATC-3')和 LY16Sr(5'-GCT TAC GCA GTT AGG CTG TC-3'),PCR 反应液同 A. 2. 2. 1。反应条件为预处理 94 $^{\circ}\text{C}$ /150 s,后 40 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ /80 s,最后于 72 $^{\circ}\text{C}$  保持 10 min。

## A. 2. 3 琼脂糖电泳

A. 2. 3. 1 制备凝胶,将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.0% 配好,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$  左右。

A. 2. 3. 2 加入溴化乙锭(1  $\mu\text{g}/1\text{ mL}$ ),混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插上样品梳。

A. 2. 3. 3 待凝胶凝固后,从制胶平台上除去封带,拔出梳子,加入足够量的 TAE(缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

A. 2. 3. 4 取 4  $\mu\text{L}$  加样缓冲液与 6  $\mu\text{L}$  PCR 和 NESTED-PCR 的反应产物混合,然后分别将其和适合的 DNA 分子量标准物加入样品孔中。

A. 2. 3. 5 接通电源进行电泳。

A. 2. 3. 6 当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段时,停止电泳。

A. 2. 3. 7 将整个胶置于紫外线光透视仪上观察,并拍照。

## A. 3 结果判定

通过观察,椰子致死黄化植原体经通用引物 P1/P7 PCR 扩增产物的电泳结果在 1.8 kbp 处有条带出现,经巢式 PCR 植原体椰子致死黄化组特异性引物 LY16Sf/LY16Sr 扩增产物的电泳结果在 1.4 kbp 处有条带出现,上述结果的出现,即可判定为阳性。

附录 B  
(规范性附录)  
DAPI 检测

B.1 试剂

B.1.1 磷酸缓冲液(PBS)×10

氯化钠 80 g  
磷酸二氢钾 2 g  
磷酸氢二钠 11.5 g  
氯化钾 2 g  
溶于 1 L 蒸馏水中。

B.1.2 乙二醇甲基丙烯酸酯(GMA)混合液

GMA 中加入 7% 聚乙二醇-400 和 0.6% 过氧化苯酰。

B.2 实验步骤

B.2.1 取材

选取呈现早期症状的椰子矛叶或未开放的佛焰苞花序,用刀片切取矛叶叶中脉或花序花柄成整齐的细条,大小为 3 mm<sup>2</sup>。取健康椰子矛叶作对照。

B.2.2 固定

将选取的样品用 4% 戊二醛(用 0.05 mol/L PBS pH 6.8 配制)固定 6h。PBS 冲洗两次。

B.2.3 脱水

系列乙醇(30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%)脱水,每级乙醇停留 2h,100% 乙醇更换两次,70% 乙醇可停留过夜。

B.2.4 包埋

脱水后的组织块在 GMA 混合液中渗透 12 h 后,更换 GMA 混合液一次,停留 24 h~48 h。将材料及 GMA 装入胶囊,于 40℃ 下 24 h,60℃ 下 60 h。

B.2.5 切片

在切片机上将固化的组织块作切片,厚为 2 μm,置培养皿内干燥。

B.2.6 切片染色

用 DAPI(0.5 μg/mL, PBS pH 7.0 配制)滴染 2 min,蒸馏水洗一次,50% 甘油封片。

B.2.7 显微镜观察

将染色切片于荧光显微镜下,观察韧皮部筛管细胞是否呈现荧光。

附 录 C  
(规范性附录)  
电子显微镜观察

### C.1 试剂试材

#### C.1.1 锇酸固定液

巴比妥-乙酸钠缓冲液的 1% 锇酸固定液

① 巴比妥钠	2.89 g
乙酸钠	1.15 g
加双蒸馏水至 100 mL	
② 取 2% 锇酸水溶液	12.5 mL
① 液	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 盐酸调至 pH 为 7.2, 即为 1% 锇酸固定液, 在冰箱保存备用。

#### C.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%。

#### C.1.3 环氧树脂

Epon 812	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 Epon 812 倒入烧杯中, 置 80°C 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。

#### C.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, 在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。

### C.2 实验步骤

#### C.2.1 取材

选取呈现早期症状的椰子矛叶或未开放的佛焰苞花序, 用刀片切取矛叶叶中脉或花序花柄成整齐的细条, 大小为 3 mm<sup>2</sup>。取健康椰子矛叶作对照。

#### C.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 pH7.4) 清洗三次。然后用 1% 锇酸后固定 2 h, PBS 清洗三次。

#### C.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。

#### C.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。

#### C.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℃下24 h,45℃下24 h,60℃下24 h。

#### C.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。

#### C.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,将乙酸双氧铀染液滴入蜡盘上。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。

#### C.2.8 显微镜观察

透射电子显微镜观察植原体形态。

---