



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2010—2007

植原体脱除方法

Method for elimination of phytoplasma

2007-12-24 发布

2008-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 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。

本标准由中华人民共和国上海出入境检验检疫局负责起草,中国检验检疫科学研究院参加起草。

本标准主要起草人:杨翠云、于翠、魏梅生、赵文军、乔艳艳、陶庭典。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

植原体脱除方法

1 范围

本标准规定了植物种苗、鳞球茎和组培苗的植原体脱除及检测的基本原则和方法。

本标准适用于进出境植物种苗、鳞球茎和组培苗的植原体脱除和检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

植原体 *phytoplasma*

寄生于植物韧皮部和介体昆虫体内的、具有三层单位膜结构的无细胞壁的原核生物。一般引起植物叶片的黄化和发育畸形等症状,对四环素族类抗生素敏感,而对青霉素不敏感。

2.2

外植体 *explant*

用于植物组织培养的材料称为外植体,其主要形式有器官、胚胎、单细胞和原生质体等。

2.3

脱植原体苗 *phytoplasma-free microplant*

应用茎尖组织培养等技术获得再生的试管苗,经检测确认不带该种植物的有害植原体,可认定为脱植原体苗。

3 原理

植原体形态一般有球形、椭圆形、长杆形、梭形、带状形和多态不规则形,大小为 50 nm~1 000 nm,其结构较病毒复杂,具有细胞结构,但没有细胞壁,被单位膜包裹,单位膜由两层蛋白质膜和中间一层脂膜组成,厚度约为 10 nm。

在植物体内植原体主要分布在韧皮部,根尖和芽尖的分生组织内植原体含量少或不含植原体。在高温下可钝化植原体,明显减弱或抑制植原体在植物体内的繁殖。植原体对四环素族类抗生素敏感,而对青霉素不敏感。

4 仪器设备、用具及试剂

4.1 仪器设备

超净工作台、光照培养箱、干燥箱、电子天平、微波炉等。

4.2 用具

镊子、剪刀、酒精灯等。

4.3 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。乙醇、漂白粉、升汞、MS 培养基试剂(见附录 A)。

5 植原体脱除方法

5.1 茎尖培养脱除植原体

5.1.1 培养材料的灭菌处理

将组织培养材料用流水冲洗干净,在凹凸不平处以及鳞片缝隙处用软刷等将污物彻底清除干净,最

后一次用蒸馏水冲洗,再用无菌纱布或吸水纸将材料上的水分吸干,并用消毒刀片切成小块。在无菌条件下先在 70% 酒精中浸 30 s~60 s,再将材料移入漂白粉饱和溶液中浸 5 min~10 min 或 0.1% 升汞水中消毒 0.5 min~3 min,最后用无菌水清洗 3 次~4 次,用无菌纸吸干水分。

5.1.2 植原体脱除的茎尖处理和培养

在无菌的环境下,用无菌刀、剪、镊等将已消毒的工具,剥去芽的鳞片、嫩枝的外皮和种皮胚乳等,将含有叶原基的茎尖组织切成 0.1 mm~1.0 mm 的小段即外植体。立即将切好的外植体接种到 MS 培养基(MS 培养基制备方法见附录 A。培养不同的植物需要在 MS 培养基制作过程中添加不同比例的生长素和细胞分裂素,pH 值为 5.0~5.8)上,每瓶接种 4 个~10 个,接种后的瓶或管用无菌药棉或盖封口,培养皿用无菌胶带封口。将接种好的材料放在温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 16 h 光照、8 h 黑暗、光照强度 1 500 lx~2 000 lx 的条件下的光照培养箱中进行培养。

5.1.3 组培苗的生长管理

在组培苗的生长过程中及时进行植原体脱除效果评定,评定方法见第 6 章。剔除含有植原体的幼苗。

5.2 茎尖培养结合热处理脱除植原体

将待处理的植物材料放入 $35^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 的温箱内,根据植物不同需要处理几十分钟,甚至几十天。

根据不同种类的植物,植原体脱除的热处理还可以选择 $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 热水处理 40 min 或 $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 热水处理 10 min。

将热处理好的植物材料取出后进行消毒和茎尖培养,方法同 5.1。在组培苗的生长过程中及时检测植原体脱除是否完全,植原体脱除效果评定见第 6 章,剔除含有植原体的幼苗。

5.3 茎尖培养结合化学处理脱除植原体

茎尖培养结合化学处理的基本方法同 5.1,只需在 MS 培养基中加入 100 mg/L~500 mg/L 四环素。对四环素敏感的植物不可采用该方法。在组培苗的生长过程中及时检测植原体脱除是否完全,植原体脱除效果评定见第 6 章,剔除含有植原体的幼苗。

6 植原体脱除效果评定

经脱除植原体的植株,需进行 PCR 方法检测(见附录 B)。如果 PCR 检测结果为阴性,即可判断植原体脱除完全;如果 PCR 检测为阳性,再进行荧光显微镜观察(见附录 C)或电子显微镜观察(见附录 D),如果任一方法观察到植原体的粒体,即可判断该植株的植原体脱除不完全,需进一步进行脱除。

7 结果记录与资料保存

完整的实验记录要包括:植株的来源、种类、进出境时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。PCR 检测需要有电泳图片,荧光显微镜检查和电镜观察需有植原体的粒体结构照片。

8 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)
MS 培养基的制备

A.1 仪器设备

电子天平、高压灭菌锅等。

A.2 试剂

A.2.1 大量元素(母液 I, 20 倍浓缩液)

硝酸铵(NH_4NO_3)	33 000 mg
硝酸钾(KNO_3)	38 000 mg
氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8 800 mg
硝酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7 400 mg
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	3 400 mg

用少量的蒸馏水彻底溶解,最后定容到 1 L,4℃ 冰箱保存。

A.2.2 微量元素(母液 II, 200 倍浓缩液)

碘化钾(KI)	166 mg
硼酸(H_3BO_3)	1 240 mg
硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4 460 mg
硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1 720 mg
钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 mg
氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	5 mg

用少量的蒸馏水彻底溶解,最后定容到 1 L,4℃ 冰箱保存。

A.2.3 铁盐(母液 III, 200 倍浓缩液)

硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5 560 mg
$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 460 mg

将称好的硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和 $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分别放到 450 mL 蒸馏水中,边加热边不断搅拌使它们溶解,然后将两种溶液混合,并将 pH 调至 5.5,最后定容到 1 L,保存在棕色玻璃瓶中,4℃ 冰箱保存。

A.2.4 有机成分 A(母液 IV, 200 倍浓缩液)

肌醇	20 000 mg
----	-----------

用少量的蒸馏水彻底溶解,最后定容到 1 L,4℃ 冰箱保存。

A.2.5 有机成分 B(母液 V, 200 倍浓缩液)

烟酸	100 mg
盐酸吡哆醇(维生素 B_6)	100 mg
盐酸硫胺素(维生素 B_1)	100 mg
甘氨酸	400 mg

用少量的蒸馏水彻底溶解,最后定容到 1 L,4℃ 冰箱保存。

A.2.6 琼脂

A.2.7 蔗糖

A.3 MS培养基的配制

A.3.1 混合培养液的配置

用量筒或移液器从各种母液中分别取出所需的用量:母液 I 为 50 mL,母液 II、III、IV 和 V 各 5 mL,一起放入烧杯中。

A.3.2 称量及溶解

分别称取琼脂 9 g,蔗糖 30 g,放入 1 L 的大烧杯中,再加入蒸馏水 750 mL,边加热边用玻璃棒搅拌,直到液体呈半透明状;然后再将配好的混合培养液加入到煮沸的琼脂中,最后加蒸馏水定容至 1 L,搅拌均匀。

A.3.3 调节 pH

用移液器吸取 1 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)溶液,逐滴滴入溶化的培养基中,边滴边搅拌,并随时用精密的 pH 试纸(5.4~7.0)测试培养基的 pH,直到 pH5.8。

A.3.4 分装

溶化的培养基应趁热分装,及时封盖瓶口。用 2 块硫酸纸中间夹 1 层薄牛皮纸封盖瓶口,并用线绳捆扎后贴上标签。

A.3.5 灭菌

培养基放在高压灭菌锅中,在 103.42 kPa(15 lbf/in²),121℃ 条件下灭菌 20 min。灭菌后取出锥形瓶,使培养基自然冷却凝固。

A.3.6 添加植物生长调节物质

培养不同的植物,还应根据需要在 MS 培养基中加入植物生长调节物质:生长素和细胞分裂素。一般来说根据诱导培养基、幼芽分化培养基和生根培养基等的要求不同,需添加不同的植物生长调节物质。

通常当配制的培养基中生长素/细胞分裂素的比例高时则有利于生根,生长素/细胞分裂素的比例低时则有利于生芽。若两者浓度相当时,既不利于生根,也不利于生芽,而是愈伤组织的产生占优势。

常用的生长素:IAA(吲哚乙酸)、IBA(吲哚丁酸)、NAA(萘乙酸)、2,4-D(4-二氯苯氧乙酸)、IPA(吲哚丙酸)、NOA(萘氧乙酸)、BT 生根粉等。

常用的细胞分裂素:6-BA(6-苄基腺嘌呤)、ABA(脱落酸)、KT(激动素)、ZT(玉米素)等。

附 录 B
(规范性附录)
PCR 检测方法

B.1 仪器设备

PCR 仪、凝胶成像系统、水浴锅、高速冷冻离心机、冰箱、微波炉等。

B.2 用具

可调式移液器、可调式移液器枪头、PCR 管等。

B.3 试剂

B.3.1 CTAB 提取缓冲液

3%CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)
100 mmol/L Tris-HCl
1.4 mol/L 氯化钠
20 mmol/L EDTA
5%PVP40
0.2%(体积分数) β -巯基乙醇(使用前加入)。

B.3.2 CTAB/NaCl 溶液

10%CTAB
0.7 mol/L 氯化钠

B.3.3 TE 缓冲液(pH8.0)

10 mmol/L Tris-HCl
1 mmol/L EDTA

B.3.4 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2)

1 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	68.4 mL
1 mol/L 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	31.6 mL
加蒸馏水至 1 L。	

B.3.5 50×TAE

Tris-碱	242 g
冰乙酸	57.1 mL
EDTA($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.2 g
加蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。	

B.3.6 6×加样缓冲液

0.25%溴酚蓝
40%(质量浓度)蔗糖水溶液

B.3.7 其他试剂

三氯甲烷-异戊醇(24:1)、丙醇、乙醇、溴化乙锭、琼脂糖等。

B.4 检测方法

B.4.1 DNA 提取

B.4.1.1 取 1 g 新鲜、幼嫩的样品组织,用液氮研磨后,分别置于 5 mL 冰浴的聚丙烯离心管中,用塑料棒研碎,加入 2 mL CTAB 提取缓冲液。

B.4.1.2 60℃ 水浴中孵育 20 min,不时摇动。

B.4.1.3 离心管中加入等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1),4℃ 8 000 r/min 离心 10 min。

B.4.1.4 取上层水相,加入经 60℃ 预热的 1/10 体积的 CTAB/NaCl 溶液,振荡,再加入等体积的三氯甲烷 4℃ 8 000 r/min 离心 10 min。

B.4.1.5 取上层水相,加入等体积异丙醇,振荡,室温放置 1 h,室温 12 000 r/min 离心 10 min。

B.4.1.6 用 1 mL 80% 乙醇洗涤,室温 10 000 r/min 离心 5 min。

B.4.1.7 小心将乙醇倒出,在吸水纸上控干,用 100 μL TE(pH8.0)溶解沉淀物,4℃ 保存。

注:也可以根据购买的 DNA 试剂盒的提取方法进行 DNA 的提取。

B.4.2 植原体通用引物

利用已报道的植原体 16SrRNA 和 16S-23SrRNA 间隔区序列的通用引物进行引物的合成。可供使用的 3 对植原体通用引物见表 B.1。

表 B.1 植原体检测的通用引物

引物对名称	目的 DNA	引物序列(5'-3')	产物大小/bp	退火温度/℃
P1/P7	16SrDNA, 16S-23SrDNA	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	1 830	50
R16mF2/R16mR1	16SrDNA	CATGCAAGTCGAACGGA CTTAACCCCAATCATCGAC	1 430	52~55
R16F2/R16R2	16SrDNA	ACGACTGCTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1 200	60

B.4.3 PCR 扩增

B.4.3.1 反应体系

反应体系 25 μL,其中模板 2 μL、10 倍 PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μL、10 mmol/L dNTP 0.6 μL、上、下游引物(20 μmol/L)0.5 μL、2 U/μL *Taq* 酶 1 μL,加灭菌水补足至 25 μL。

B.4.3.2 PCR 反应条件

94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 45 s、50℃~60℃ 复性 45 s(根据所选引物确定退火温度)、72℃ 延伸 2 min,30 个~35 个循环;72℃ 延伸 10 min 后保存于 4℃。

B.4.3.3 对照设定

PCR 扩增需设阴性对照(模板为双蒸水)和阳性对照(模板为已知含植原体材料)。

B.4.4 琼脂糖凝胶检测

B.4.4.1 用 1×TAE 配置 1.5% 电泳级琼脂糖,在水浴中溶化混匀,冷却至 55℃ 左右。

B.4.4.2 取 10 mg/mL 的溴化乙锭 5 μL,加入到 100 mL 制备的凝胶中,混匀后倒入凝胶槽中,插上样品梳子。

B.4.4.3 凝胶凝固后,取掉梳子,将加样缓冲液与样品混合后加入样品孔,并加入分子量标准物。

B.4.4.4 接通电源,根据凝胶的厚度,缓冲液浓度等设置使用的电压,电泳 0.5 h。

B.4.4.5 电泳结束后用凝胶成像系统记录结果。

B.5 结果判定

在阳性对照出现与相应引物对应大小的 PCR 扩增片断,阴性对照未出现对应大小的片断的前提下,如果样品出现对应大小的扩增片断,且经序列分析结果为植原体序列,则判定样品为阳性;如果样品未出现对应大小的扩增片断,样品为阴性。

附 录 C
(规范性附录)
荧光显微镜观察

C.1 仪器设备

荧光显微镜。

C.2 试剂

C.2.1 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2)

1 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 68.4 mL

1 mol/L 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4) 31.6 mL

加蒸馏水至 1 L。

C.2.2 其他试剂

戊二醛、DAPI(4,6-二脒基-2-苯基吲哚)。

C.3 方法

C.3.1 取材

取植物的叶片主脉、幼茎、叶柄或根等组织,进行组织切片,厚度在 100 μm 左右。

C.3.2 染色

用 5%戊二醛固定材料 2 h,经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2)洗涤后,用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染色 5 min。

C.3.3 荧光观察

将染色后的材料置于落射荧光显微镜下,检查韧皮部特异性植原体 DNA 荧光。激发滤光片波长为 365 nm,阻断滤光片波长为 420 nm。

C.4 结果判定

在荧光显微镜下,如观察到植原体的 DNA 荧光,则判定为阳性。

附 录 D
(规范性附录)
电子显微镜观察

D.1 仪器设备

透射电子显微镜。

D.2 试剂**D.2.1 包埋剂**

环氧树脂(Epon-812)	5 mL
十二烷基琥珀酸酐(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 倒入烧杯内,置于 80℃ 温箱内融化,然后加入 DDSA,充分搅拌至融化呈透明状。冷却至室温后加入 D. B. P,仔细搅拌,然后慢慢逐滴加入 D. M. P-30,边加边搅拌,这时包埋剂呈棕红色。为避免潮解,操作应在干燥箱内进行。

在南方等气候潮湿的地区,包埋剂使用 spurr 树脂,配方如下:

VCD 树脂	10 g
DER736	6 g
NSA	26 g
DMAE	0.4 g

以上各成分按顺序加上 100 mL 烧杯中,用玻璃棒充分混匀前三者后,最后加入 DMAE 混匀。该包埋剂聚合温度为 70℃,时间为 16 h。

D.2.2 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2)

1 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	68.4 mL
1 mol/L 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	31.6 mL
加蒸馏水至 500 mL。	

D.2.3 其他试剂

戊二醛、四氧化锇、丙酮、聚乙烯醇缩甲醛、三氯甲烷、二甲苯、柠檬酸铅和醋酸双氧铀。

D.3 方法**D.3.1 预固定**

挑选有明显症状的待检样品,将其切成 1 mm×2 mm 的小块,用 2.5% 戊二醛固定液(pH 值为 7.2),4℃,固定 3 h。

D.3.2 漂洗

样品用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.2)漂洗 3 次。

D.3.3 后固定

用 1.0% 的四氧化锇(pH 值为 7.2)进行后固定,4℃,2 h。用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 20 min。

D.3.4 脱水

以 20%、50%、70%、90%、100% 丙酮逐级脱水,每次 15 min。

D.3.5 浸透及包埋

将充分脱水干净的组织浸入丙酮-包埋剂(1:1)浸透 2 h,再浸入丙酮-包埋剂(1:4)浸透过夜,第

二天将组织浸入纯包埋剂 2 h~3 h。

用镊子将组织块放置包埋模板中,倒入包埋液,放上标签,在 45℃ (3 h~6 h) 和 60℃ (36 h~48 h) 烤箱内加温,即可聚合硬化,形成包埋块。

D.3.6 Formvar 膜制备

将聚乙烯醇缩甲醛(Formvar)溶于三氯甲烷,配成 0.2%~0.3% 的溶液,贮于冰箱内备用。制膜时取一块干净的玻璃片插入溶液中,取出倾斜待三氯甲烷挥发,用镊尖沿玻璃边划痕,再将玻璃倾斜进入蒸馏水中,薄膜即从玻璃上脱落下来漂浮在水面,取干净的铜网摆上,压紧,再用一块滤纸覆盖其上,捞起后置培养皿内干燥备用。

D.3.7 切片

将包埋块夹在特制的夹持器上,放在解剖显微镜下,用锋利的刀片先削去表面的包埋剂,露出组织,然后在组织的四周以和水平面成 45° 的角度削去包埋剂,修成锥体形,于超薄切片机切取样品。

选择好的切片用二甲苯蒸发展开,最后用载有 Formvar 膜的铜网捞起,置培养皿内干燥、保存。

D.3.8 染色及观察

采用柠檬酸铅和乙酸双氧铀双重染色。取染色用蜡盘数个,滴管吸取乙酸双氧铀染液滴入蜡盘上。取带切片的铜网,插入染色液中,染色 10 min~20 min 后,取出铜网,蒸馏水洗去多余洗液,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,切片和染液接触 10 min~20 min 后再用 0.1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)漂洗干净,滤纸吸干。在透射电子显微镜下观察韧皮部筛管内植原体的形态及数量。

D.4 结果判定

在透射电子显微镜下观察到植原体粒体,则判定为阳性。