



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2398—2010

苹果丛生植原体检疫鉴定方法

Identification of candidatus *phytoplasma mali*

2010-01-10 发布

2010-07-16 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

本标准部分采用 EPPO 植物检疫标准(PM 7/62(1)),主要技术差异如下:

- 删除 ELISA 检测方法;
- 删除指示植物鉴定方法;
- 添加电子显微镜观察方法。

本标准的附录 B、附录 C、附录 D 为规范性附录,附录 A 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位:中国检验检疫科学研究院。

本标准参加起草单位:中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、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:黄新、牟海青、邓从良、杨旭光、张祥林、王有福、朱水芳。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

苹果丛生植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了苹果丛生植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境苹果苗木及接穗中苹果丛生植原体的检疫和鉴定。

2 原理

2.1 分类地位

苹果丛生植原体(*Candidatus Phytoplasma mali*, Apple proliferation phytoplasma, AP), 软壁菌门, 柔膜菌纲, 不需固醇菌原体目, 不需固醇菌原体科, 植原体属, 16S rX 植原体组。

2.2 检测方法

其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 荧光染色方法操作简便、成本低, 在本标准中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 技术结合作为鉴定苹果丛生植原体的准确方法。

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、常规冰箱、旋涡振荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统。

DAPI、PCR 缓冲液、氯化镁、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物等。

4 检测鉴定方法

4.1 症状观察

仔细观察苹果种苗、果实、叶片等, 症状描述参见附录 A。

4.2 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 $1 \mu\text{g/mL}$ 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 通用引物 PCR 凝胶电泳及 RFLP 检测

通用引物 PCR 凝胶电泳及 RFLP 检测见附录 B。

4.4 特异性引物 PCR 凝胶电泳检测

特异性引物 PCR 凝胶电泳检测见附录 C。

4.5 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 D。

5 结果判定

5.1 表现症状与 A. 1.1 描述一致且 DAPI 染色观察结果显示蓝色荧光, 可初步判定为苹果丛生植原体, 但需通过 5.2、5.3、5.4 中任意方案进一步检测。

5.2 在 4.3 检测中, 若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性, 而且 RFLP 分析片段大小与描述相符, 可判定该样品携带苹果丛生植原体或 16S rX 组的植原体。

5.3 在 4.4 检测中,若通过 f01/r01 引物 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测结果为阳性,而且 RFLP 分析片段大小与描述相符,可判定该样品携带苹果丛生植原体。

5.4 在 4.4 检测中,若通过 AP5/AP4 引物 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测结果为阳性,可判定该样品携带苹果丛生植原体。

5.5 在 4.5 检测中,电镜超薄切片在韧皮部筛管细胞中存在大量植原体,可判定该植物样品携带植原体。

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。对检出苹果丛生植原体的样品应保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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)

相关资料

A.1 苹果丛生植原体

A.1.1 表现症状

该植原体病害最典型症状为枝梢丛枝,叶片常变小,且托叶不正常增大。果实较小,常扁平,花序梗变长。早期症状为叶片发红,冬季苗圃中植株的毛状根系可能是症状之一,有时有隐症现象。

A.1.2 寄主范围

苹果是主要的寄主,各种栽培品种对病菌的反应不同,但是大多数(包括幼苗)表现感病。最感病的品种包括: Bell De Boskoop, 格拉文施泰因苹果(Gravenstein), 红星苹果(Starking), 皇冠苹果(Golden Delicious)及 Winter Banana 品种, Roja de Benejama 是最耐病的品种。侵染梨树时也会出现相应症状。

A.1.3 传播途径

主要由取食植株韧皮部的介体昆虫传播,如木虱(*Cacopsylla melanoneura*)、叶蝉(*Fieberiella florii*)等;感病苹果种苗、接穗等调运可以使植原体病原远距离传播。苹果植株之间的嫁接可以传播苹果丛枝病,另有报道嫁接能够将植原体从苹果树传到梨树上。

A.1.4 地理分布

奥地利、捷克、斯洛伐克、法国、罗马尼亚、西班牙、瑞士、英国、俄罗斯、克罗地亚、印度、南非等地区。

A.2 植原体细胞的富集

植原体细胞富集缓冲液(100 mL): 无水磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 1.67 g, 磷酸二氢钾(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 的氢氧化钾调节 pH 值至 7.6。

称取新鲜样品叶中脉 1.5 g, 加入 7 mL~8 mL 新制备的提取缓冲液, 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 °C 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 °C 预热的 2 mL 2% CTAB 溶液, 重悬沉淀; 60 °C 水浴中温浴, 并不定期的摇动。

A.3 DNA 提取

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

将 1 mL 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 °C 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 °C 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 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 离心 10 min; 弃上清液, 加入 500 μ L 的 70% 的乙醇, 再 15 000g 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 °C 的条件下可以冻存 1 年。

附 录 B

(规范性附录)

通用引物 PCR 扩增以及 RFLP 分析

B.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'。

植原体通用引物: fU5: 5'-CGG CAA TGG AGG AAA CT-3', rU3: 5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA-3'。

B.2 PCR 反应体系及参数

B.2.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 B.1。

表 B.1 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 反应缓冲液	1×
氯化镁	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
<i>Taq</i> 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。	

B.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照: 以健康的苹果叶片 DNA 为模板。

阳性对照: 以携带有苹果丛生植原体 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。

B.2.3 PCR 的反应参数

R16F2n/R16R2: 94 °C/2 min; 94 °C/1 min, 60 °C/30 s, 72 °C/3 min, 40 个循环; 72 °C 4 min。

fU5/rU3: 94 °C/2 min; 94 °C/20 s, 55 °C/20 s, 72 °C/1 min, 40 个循环; 72 °C 4 min。

注: 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

B.3 琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶, 以 DNA Marker 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。

B.4 RFLP 分析

所用限制性内切酶为 *Alu* I, 反应体系: 总体积 20 μL; 1×缓冲液, 2 U *Alu* I, 10 μL 的 PCR 产

物。置于 37 ℃ 温育至少 2 h,电泳同第 B.3 章,琼脂糖凝胶浓度改为 2%。

B.5 结果判断

R16F2n/R16R2 引物扩增产物 RFLP 电泳出现 476,229,189,150,139 和 56 bp 条带,可判定为阳性。

fu5/rU3 引物扩增产物 RFLP 电泳出现 476,189,149 和 56 bp 条带,可判定为阳性。



附 录 C

(规范性附录)

特异性引物 PCR 凝胶电泳检测及 RFLP 分析

C.1 引物序列

16S rX 组特异性引物:f01 5'-CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT-3';r01 5'-AAG TGC CCA ACT AAA TGA T-3'。

苹果丛枝植原体特异性引物:AP5:5'-TCT TTT AAT CTT CAA TGG C-3';AP4:5'-CCA ATG TGT GAA ATC TGT AG-3'。

C.2 PCR 反应体系

同 B.2.1。

C.3 PCR 的反应参数

f01/r01:94 °C/2 min;94 °C/20 s,55 °C/20 s,72 °C/1 min,40 个循环;72 °C 4 min。

AP5/AP4:95 °C/1 min;95 °C/10 s,58 °C/15 s,72 °C/45 s,40 个循环;72 °C 4 min。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

C.4 琼脂糖凝胶电泳

同第 B.3 章。

C.5 RFLP 分析

f01/r01 扩增产物分别用限制性内切酶为 *Ssp* I 与 *Sfe* I,反应体系:总体系 20 μL;1×缓冲液,2 U *Alu* I,10 μL 的 PCR 产物。置于 37 °C 温育至少 2 h,电泳同第 B.3 章,琼脂糖凝胶浓度改为 2%。

C.6 结果判定

f01/r01 扩增产物为 1 071 bp,分别经限制性内切酶为 *Ssp* I 与 *Sfe* I 酶切后,分别在 419 bp、998 bp 处有特异性条带可判定为阳性;

AP5/AP4 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳出现 483 bp 的片段,可以判定为阳性。

附 录 D

(规范性附录)

电子显微镜观察

D.1 试剂试材

D.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 |
| 加双蒸水至 100 mL | |
| ② 取 2% 锇酸水溶液 | 12.5 mL |
| 加①液 | 5.0 mL |
| 0.1 mol/L 盐酸 | 5.0 mL |
| 加双蒸水至 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。

D.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任何缓冲液中使用, 终浓度为 25%。

D.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 Epon812 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, 待融化呈透明, 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。

D.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, 取出倾斜玻璃待三氯甲烷挥发, 用镊子沿玻璃边划痕, 将玻璃倾斜入蒸馏水中, 薄膜即从玻璃片上脱落下来漂浮于水面, 取干净的铜网摆上, 压紧, 再用一块滤纸覆盖其上, 捞起后置于培养皿干燥备用。

D.2 实验步骤

D.2.1 取材

选取呈现早期症状的苹果丛枝叶, 用刀片切成整齐的细条, 大小为 3 mm²。取健康苹果叶做对照。

D.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。

D.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。

D.2.4 渗透

脱水后的组织块在丙酮/树脂中渗透 3 d,再在全树脂中渗透 1 d。

D.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,60 ℃下 24 h。

D.2.6 切片

在超薄切片机上将固定的组织块作切片。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。

D.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,蒸馏水洗去多余染色液滤纸吸干。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上,染 20 min~30 min,再用 0.1 mol/L 氢氧化钠漂洗干净,滤纸吸干。

D.2.8 显微镜观察

透射电子显微镜观察植原体形态。
