



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2482—2010

马铃薯丛枝植原体检疫鉴定方法

Identification of potato witches' broom phytoplasma

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

本标准的附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院负责起草。

本标准主要起草人：王秀芬、赵文军、刘伟、彭金火、牟海青、周铭、朱水芳。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

马铃薯丛枝植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯丛枝植原体的检疫鉴定方法。

本标准适用于所有进境种薯、商品薯、组培苗和脱毒苗等马铃薯种质中马铃薯丛枝植原体的检疫鉴定。

2 原理

2.1 学名和分类地位

学名: Potato witches' broom phytoplasma

缩写: PWB

分类地位: 细菌界 (Bacteria), 硬壁菌门 (Firmicutes), 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 (*Phytoplasma*), 三叶草丛簇组 (Clover proliferation group, 16Sr W)。

其他资料参见附录 A。

2.2 鉴定原理

马铃薯丛枝植原体的分子生物学特性为本标准鉴定方法的主要依据。

3 仪器和用具

3.1 仪器设备: PCR 仪、超净工作台、电泳仪、凝胶成像分析仪、冷冻离心机、电子天平 (1/10 000 g)、pH 计、水浴锅、振荡器等。

3.2 用具: 可调移液器 (0 μ L~20 μ L、20 μ L~200 μ L、200 μ L~1 000 μ L) 及相关吸头、研钵、离心管 (1.5 mL、10 mL)、PCR 管 (0.2 mL)、量筒、烧杯、镊子等。

4 试剂

4.1 研磨液

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	0.1 mol/L
磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)	0.03 mol/L
EDTA	10 mmol/L (pH8.0)
蔗糖	10% (质量浓度)
PVP-40	2% (质量浓度)

调整 pH 至 7.6, 然后过滤除菌。

使用前加入 0.15% (质量浓度) 牛血清白蛋白 (BSA) 和 1 mmol/L 抗坏血酸维生素 C。

4.2 CTAB 缓冲液

CTAB	2% (质量浓度)
Tris-HCl	100 mmol/L (pH8.0)
EDTA	20 mmol/L (pH8.0)
氯化钠 (NaCl)	1.4 mol/L
PVP-40	1% (质量浓度)

4.3 其他试剂

苯酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇、琼脂糖、溴化乙锭、*Taq* DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、dNTP 液(2.5 mmol/L dATP,dTTP,dCTP,dGTP)。

5 检疫鉴定

5.1 DNA 提取

大约 0.3 g 组织(叶柄、叶脉、茎)在 3 mL 预冷研磨液中研磨,将粗汁液转移至 2 mL 微量离心管中。4℃下 4 500 r/min 离心 5 min。将悬浮液转至新的 2 mL 离心管中。4℃下 13 000 r/min 离心 15 min。去掉上清液。在 750 μL 预热(55℃)CTAB 缓冲液中悬浮沉淀[少量 CTAB 缓冲液(如 100 μL)更易悬浮沉淀,然后加入剩余的 CTAB 缓冲液(如 650 μL)]。55℃下孵育 30 min,间歇颠倒混匀。离心管在冰上冷却 30 s。加入 750 μL 三氯甲烷:异戊醇(24:1 体积比),涡旋振荡。4℃或室温下 13 000 r/min 离心 4 min。小心将上面水相转至一个新的 1.5 mL 离心管中。加入 1 体积预冷异丙醇,涡旋振荡。冰上孵育 4 min 后 4℃或室温下 13 000 r/min 离心 10 min。去掉上清液。用 500 μL 70%(体积分数)冷乙醇洗涤 DNA 沉淀,4℃或室温下 13 000 r/min 离心 1 min。空气干燥 DNA 沉淀。用 20 μL 灭菌蒸馏水悬浮沉淀。55℃下孵育离心管 10 min 有助于 DNA 再悬浮。−20℃短期贮存或−80℃长期贮存。

注:也可采用商品试剂盒提取。

5.2 引物序列

引物采用植原体 16SrDNA(参见附录 B)通用引物 P1/P7 和 R16F2n/R16R2。引物序列见表 1。

表 1 PCR 检测的引物

	引物名称	引物序列 5'-3'	产物/bp
通用引物	P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	1 800
	R16F2n R16R2	ACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1 251

5.3 巢式 PCR

用引物 P1/P7 进行第 1 轮 PCR。反应体系见表 2。反应条件为:94℃/5 min;94℃/30 s,53℃/30 s,72℃/1 min,35 个循环;72℃/10 min。

表 2 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/μL
10×PCR 缓冲液	2.0
50 mmol/L 氯化镁	0.6
10 mmol/L dNTP	0.4
5 μmol/L 上游引物	1.0
5 μmol/L 下游引物	1.0
5 U/μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.1
10 ng/μL 模板 DNA	2.0
双蒸水	补足反应总体积为 20 μL

第 1 轮 PCR 产物用灭菌双蒸水 1:50(体积比)稀释,取 1 μL 为模板利用通用引物 R16F2n/R16R2 进行第 2 轮 PCR 反应,反应体系见表 2。R16F2n/R16R2 反应条件为:94℃/5 min;94℃/30 s,

60℃/30 s, 72℃/1 min, 35 个循环; 72℃/10 min。

上述反应中均需同时作阳性对照(植原体 16S rDNA 质粒)、阴性对照(健康马铃薯叶片)和空白对照(以蒸馏水替代模板 DNA)。

用 1×TAE 电泳缓冲液制备 1% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭), 用 1 μL 6×加样缓冲液与 5 μL 第二轮 PCR 扩增产物混合, 然后将其和适合的 DNA 分子量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统观察并保留结果。

5.4 PCR 产物序列 RFLP 图谱分析

将第二轮 PCR 产物进行序列测定。所测序列通过 DNA-FP Cluster 1.0 软件进行 RFLP 图谱分析, DNA 分子量标准选用 Invitrogen 25 bp DNA Ladder, 琼脂糖凝胶浓度为 3%, 最小片段选为 10 bp。

6 结果评定

在阳性对照有目标条带, 而阴性对照及空白对照没有条带时, 第二轮 PCR 产物在 1 251 bp 处有条带出现, 且序列 RFLP 图谱分析结果与马铃薯丛枝植原体标准图谱一致, 即判断样品带有马铃薯丛枝植原体; 第二轮 PCR 产物在 1 251 bp 处没有条带, 判定样品不带有马铃薯丛枝植原体。

7 样品保存

对于检测结果显示为阳性的样品, 应对样品进行保存。病样在 -20℃ 或者 -80℃ 冰箱中保存, 做好标记和登记工作。

8 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、接收时间, 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 检测需有电泳结果照片及测序结果。

附录 A

(资料性附录)

马铃薯丛枝植原体背景资料

A.1 分布

亚洲:中国(台湾)、印度、日本、乌兹别克斯坦。

欧洲:保加利亚、前苏联(欧洲部分)、意大利、波兰、俄罗斯联邦(欧洲部分)、乌克兰。

大洋洲:澳大利亚、汤加。

北美洲:加拿大、美国。

A.2 寄主范围

荷包牡丹(*Dicentra spectabilis*)、紫苜蓿(*Medicago sativa*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、杂种车轴草(*Trifolium hybridum*)、红车轴草(*Trifolium pratense*)、白车轴草(*Trifolium repens*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、柳属(*Salix*)。

A.3 症状

感病马铃薯植株徒长,顶部叶片变紫色并卷曲,花变绿色、僵化,露出土表的马铃薯部分长出很多枝芽,并长出许多匍匐枝,土表下的马铃薯块茎长出许多根,上部植株胶质化,茎干细小,生产的马铃薯个体小,产量低。病害后期植株维管束死亡,植株枯死。

A.4 传播途径

马铃薯种薯及组培苗是该病原菌远距离传播主要途径,叶蝉(*Scleroracrus flavopictus*、*Scleroracrus dasidus*、*Scleroracrus balli*)是传播介体。

A.5 分子生物学特性

植原体基因组包括染色体与染色体外(质粒)两部分,遗传物质为 dsDNA,相对分子质量约为 5×10^8 道尔顿。此外,植原体基因组 DNA 中,G+C 含量较低,为 23%~29.5%,A+T 含量较丰富。16S rDNA 基因是原核生物的高度保守序列,在植原体及其他支原体原核生物的分类研究中,它常作为系统分类比较的主要特征。

A.6 病菌形态特征

马铃薯病株茎、叶筛管和靠近筛管的薄壁细胞细胞质内,有大小不一,形态多数为球形或椭圆形的植原体存在。植原体初生体的直径多为 60 nm~100 nm,呈电子密集及微颗粒状。植原体有细胞壁,但在其外表包有单位膜。单位膜由 2 层蛋白质膜和中间一层脂肪膜组成,厚度约为 10 nm。在显微镜下,植原体的内含物清晰可见,胞内含有核糖体,脱氧核糖核酸线状体和核糖核酸线状体。

附录 B

(资料性附录)

马铃薯丛枝植原体核糖体 16S rDNA 序列

B.1 马铃薯丛枝植原体核糖体 16S rDNA 序列(引物 R16F2n/R16R2 扩增产物)

GAAACGGTTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTTAAAAGA
 CCTTCTTACGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTAGAGTA
 AAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAA
 ACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTAT
 TGAAGAAGAAAAAGTAGTGGA AAAA ACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCT
 AACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGT
 CTTGTTATAGAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAG
 CGGTAAAAATGTGTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTT
 TACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTG GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTA
 AGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCC
 GCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTT
 GACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCA
 TGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTAAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCC
 TTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATTAAACATT
 GGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTG
 ATACAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAGC
 AGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACCTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATC
 CGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

B.2 马铃薯丛枝植原体核糖体 16S rDNA 序列指纹图谱

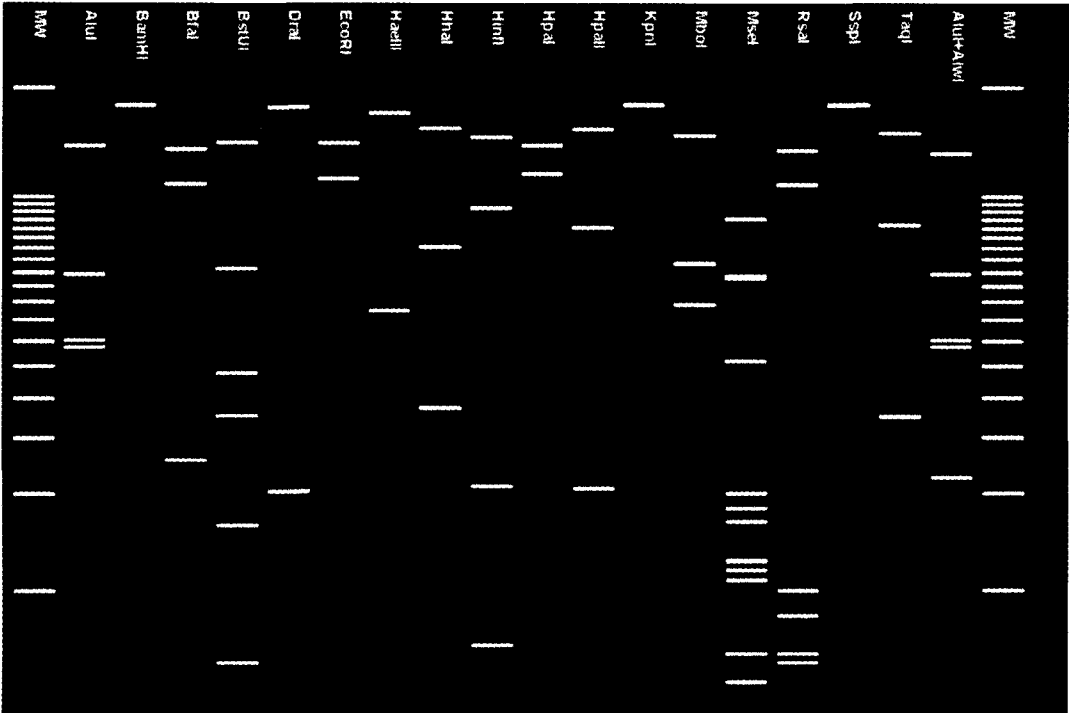


图 B.2 马铃薯丛枝植原体核糖体 16S rDNA 序列指纹图谱