



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5139—2019

马铃薯斑纹片病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Candidatus Liberibacter solanacearum*

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国满洲里海关，中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国呼和浩特海关。

本标准主要起草人：刘玮琦、赵文军、田茜、潘绪斌、杨永生、杭小溪、刘文敏、张贵、孟斌。

马铃薯斑纹片病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯斑纹片病菌的检测方法。
本标准适用于进境马铃薯、番茄、辣椒等茄科植物,以及胡萝卜、芜荂、芹菜等伞形科植物的种子、种苗、块茎、块根等植物材料以及传播介体木虱中马铃薯斑纹片病菌的检疫鉴定。

2 马铃薯斑纹片病菌基本信息

中文名称:马铃薯斑纹片病菌
拉丁学名:*Candidatus Liberibacter solanacearum* Liefting et al., 2009
英文名称:zebra chip, zebra complex
中文异名:斑马片病、马铃薯斑纹菌
同物异名:*Candidatus Liberibacter psyllae* Hansen et al., 2008
分类地位:属原核生物界(Kingdom Monera),变形菌门(Proteobacteria), α -变形菌纲(Alphaproteobacteria),根瘤菌目(Rhizobiales),叶杆菌科(Phyllobacteriaceae),韧皮部杆菌属(*Candidatus Liberibacter*)。
传播途径:马铃薯木虱、胡萝卜木虱、*Bactericera trigonica* 和 *B. maculipennis* 等木虱是马铃薯斑纹片病的传播介体,其通过取食染病植物携带病菌并进行传播。此外,还可随种子、种苗、块茎和块根等繁殖材料远距离传播,也可通过嫁接传播。
马铃薯斑纹片病菌其他信息参见附录 A,病害症状及传播介体图片参见附录 B。

3 方法原理

主要以分子生物学特征为本标准鉴定方法的主要鉴定依据。

4 仪器设备和主要试剂

4.1 仪器设备

超净工作台、高速冷冻离心机、研磨机、小型研磨仪、拍打式均质仪、台式小型离心机、常规冰箱、漩涡振荡器、微量进样器、电子天平、pH 计、水浴锅、纯水仪、高压灭菌器、超低温冰箱、荧光定量 PCR 仪、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像分析仪、制冰机等。

4.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。Triton X-100、PBS 缓冲液、PCR 缓冲液、dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、*Taq* DNA 聚合酶、引物和探针、异丙醇、无水乙醇、DNA 提取试剂见附录 C。

5 病菌的鉴定

5.1 症状检查

取样品量 1%~5%(若样品少可适当增大比例)的叶片、茎秆和块茎等部位进行检查。在不同寄主甚至同一寄主不同品种上的为害症状及为害程度均有差异。症状参见附录 A 和附录 B。

5.2 样品制备

5.2.1 植株材料样品制备

植物材料用研磨仪或液氮进行匀浆处理,从有症状的植物上取 3 片-5 片植物叶片或茎。在无症状的植物上不同部位取 5 片-10 片叶子(包括新生的叶片)或茎秆。选取症状明显的植物地下部分进行检测,如马铃薯块茎,胡萝卜根等。在进行提取之前,要对材料进行二次取样,以保证材料包含较多的维管束组织,例如:叶柄,叶中脉,形成层,或马铃薯块茎维管束环等。

5.2.2 种子样品制备

种子样品可用研钵研磨,也可用研磨机处理,或置塑料袋内用锤子粉碎。或采用拍打式均质仪处理代替研磨。种衣剂处理过的种子应先去除种衣,将种子在 1:10(w/v)0.5% Triton X-100 中振荡洗涤 30 min,洗 3 次后在水中过夜软化。1 g-2 g 胡萝卜种子(约 450 粒-900 粒)样品加入 50 mL-100 mL PBS(NaCl, 8 g /L; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.4 g/L; Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.7 g /L; pH 7.2) 缓冲液 4 ℃ 冰箱浸泡过夜;弃缓冲液,种子用研磨仪研磨处理,研磨后加 20 mL-40 mL PBS 缓冲液,震荡混匀,纱布或滤纸过滤,滤液用于提取 DNA。

也可用 PBS 缓冲液 (NaCl, 8 g /L; KH₂PO₄, 0.24 g/L; Na₂HPO₄, 1.44 g /L; KCl,0.2 g/L; pH 7.2)。

5.2.3 木虱样品制备

取 10 只-30 只木虱放入离心管中加适量裂解液用小型研磨仪研磨,或放在研钵中加入液氮研磨备用。

5.3 PCR 初筛

5.3.1 样品 DNA 提取

取植物组织或种子处理液过滤后的滤液 1mL-2 mL,10000 r/min 离心 5 min,沉淀提取 DNA。可用常规的 CTAB 提取方法,也可用商用 DNA 提取试剂盒。木虱样品制备后可用商业化试剂盒提取 DNA。

5.3.2 分子生物学检测

本标准采用常规 PCR、巢式 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法,分别见附录 C、D 和 E,重复 3 次。用马铃薯斑纹片病菌 DNA 作阳性对照,用健康马铃薯 DNA 作阴性对照,用灭菌蒸馏水作空白对照。

6 结果判定

若常规 PCR、巢式 PCR 和实时荧光 PCR 三种检测方法,任一方法检测为阳性,可判定检出马铃薯斑纹片病菌。

7 样品保存

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出马铃薯斑纹片病菌的样品应保存于 4℃ 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。

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、接受时间、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)

马铃薯斑纹片病菌其他相关信息

A.1 症状特征

斑纹片病主要危害寄主植物的叶片、枝干、果实等部位,在不同寄主甚至同一寄主不同品种上的危害症状及危害程度均有差异。马铃薯,番茄和其他茄科植物地上部分症状与植原体症状类似,包括:矮化,新叶直立,叶片褪绿发紫,全株叶片向上卷曲,节间缩短,变粗,形成簇叶,节间膨大,腋生小枝或气生块茎,叶焦枯,果实畸形,量多而细小,发育停滞,品质差。

马铃薯的地下症状包括匍匐茎倒伏,维管束组织变褐,伴随着内部组织的坏死斑和髓部组织的条纹。薯片油炸后,这些症状更加明显,薯条或薯片出现黑斑或斑纹,从而失去商用价值。该病害因马铃薯块茎上的斑纹症状而命名为“斑纹片病”。

胡萝卜上的症状与植原体和螺旋体病害症状相似,包括:卷叶,黄化,叶子发紫或红棕色,幼苗和根矮缩以及次生根增生。

A.2 寄主范围

目前报道的寄主有茄科和伞形科植物,茄科包括:马铃薯 *Solanum tuberosum*,番茄 *S. lycopersicum*,辣椒 *Capsicum annuum*,树番茄 *S. betaceum*,烟草 *Nicotiana tabacum*,茄子 *S. melongena*,灯笼果 *Physalis peruviana*,银叶茄 *S. elaeagnifolium*,东方龙葵 *S. ptycanthum* 和枸杞 *Lycium barbarum* 等。伞形花科包括:胡萝卜 *Daucus carota*,芹菜 *Apium graveolens*,茴香 *Foeniculum vulgare*、芫荽 *Petroselinum crispum*、欧防风 *Pastinaca sativa*、香芹 *Libanotis seseloides* 和欧洲萝卜 *Pastinaca sativa* 等。其潜在寄主范围比已知寄主范围更广泛。

A.3 分布

目前全世界 17 个国家和地区已有报道,其分布范围还在不断扩大,具体分布的国家和地区如下:

北美洲:墨西哥、美国。

中美洲:萨尔瓦多、危地马拉、洪都拉斯、尼加拉瓜。

大洋洲:新西兰。

欧洲:芬兰、法国、挪威、西班牙、瑞典、德国、奥地利、英国。

非洲:摩洛哥。

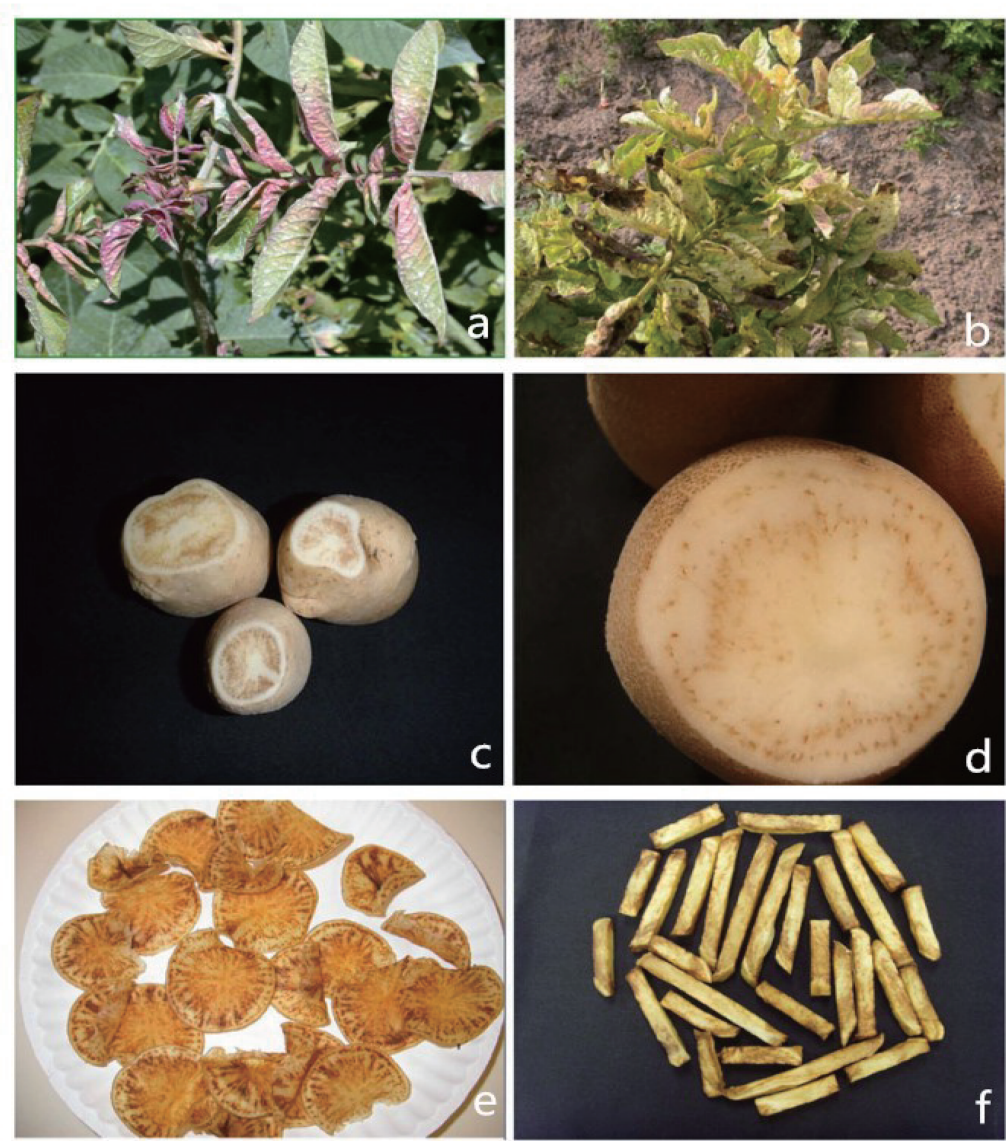
亚洲:以色列。

A.4 侵染途径

病菌可通过带菌薯块和种子等繁殖材料进行远距离传播;田间通过昆虫介体传播。此外,病菌还可通过嫁接、染病植株、带菌种子和马铃薯种薯等进行传播和扩散。

目前报道的传播介体包括:马铃薯木虱 *Bactericera cockerelli*、胡萝卜木虱 *Trioza apicalis*、木虱 *B. trigonica* 和木虱 *B. maculipennis*。

附 录 B
(资料性附录)
病害症状及传播介体图片



a-b: 叶片；c-f: 块茎。

图 B.1 马铃薯叶片和块茎症状(引自 Munyaneza J E.)



图 B.2 番茄上的卷叶褪绿和黄化症状



图 B.3 番茄上的褪绿和黄化症状



图 B.4 胡萝卜上的症状 (a.卷叶和紫化;b.仅有卷叶;c.无症状)



图 B.5 马铃薯木虱卵若虫和成虫

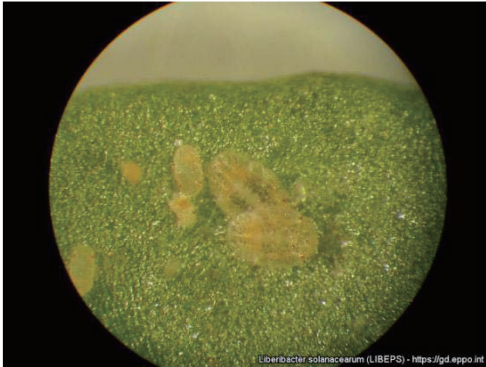


图 B.6 马铃薯木虱成虫

(图 B.2 和图 B.3 由新西兰初级产业部植物健康与环境实验室唐子颖博士提供;图 B.4、图 B.5 和图 B.6引自 EPPO)

附 录 C
(规范性附录)
常规 PCR 方法

C.1 常规 PCR 扩增

引物 Lso TX 16/23 F(5'-aatttttagcaagttctaaggg-3')/Lso TX 16/23 R(5'-ggtacctcccatatcgc-3')；反应程序为：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,40 个循环；72 ℃ 5 min。预期扩增产物为 383 bp。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	浓度	加样量/ μ L
PCR 缓冲液	10 $\times$	2.5
氯化镁	50 mmol/L	2.0
dNTP	10 mmol/L	2.0
上游引物	10 μ mol/L	1.0
下游引物	10 μ mol/L	1.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ μ L	0.5
模板 DNA	$\geq$ 10 ng/ μ L	1.0
ddH ₂ O		补至 25 μ L

上述反应中均需同时作阳性对照(马铃薯斑纹片病菌)、阴性对照(健康马铃薯叶片)和空白对照(以蒸馏水代替模板 DNA)。

C.2 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 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的紫外投射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

C.3 结果判定

PCR 扩增产物电泳检测,阳性对照出现预期扩增片段,阴性对照没有目标条带,待检样品如出现预期扩增片段为阳性,如未出现预期扩增片段为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
巢式 PCR 方法

D.1 巢式 PCR 扩增

引物采用马铃薯斑纹片病菌 16S rDNA 通用引物 OA2/OI2c 和 Lib16S01F/Lib16S01R。引物序列见表 D.1。

表 D.1 巢式 PCR 检测的引物

引物名称	引物序列 5'-3'	产物/bp
OA2 OI2c	gcgcttatTTTtaataggagcggca gcctcgcgacttcgcaacccat	1160
Lib16S01F Lib16S01R	ttctacgggataacgcacgg cgtcagtatcaggccagtgag	580

用引物 OA2/ OI2c 进行第 1 轮 PCR 反应。反应条件为:94 ℃/5 min; 94 ℃/30 s, 58 ℃/30 s, 72 ℃/1 min, 30 个循环; 72 ℃/10 min。PCR 反应体系见表 D.2。

表 D.2 PCR 反应体系

试剂名称	浓度	加样量/μL
PCR 缓冲液	10×	2.5
氯化镁	50 mmol/L	2.0
dNTP	10 mmol/L	2.0
上游引物	10 μmol/L	1.0
下游引物	10 μmol/L	1.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5U/μL	0.5
模板 DNA	≥10ng/μL	1.0
ddH ₂ O		补至 25 μL

取第一轮 PCR 产物 1 μL 为模板利用通用引物 Lib16S01F/Lib16S01R 进行第 2 轮 PCR 反应,反应体系见表 D. 2。反应条件为: 94 ℃/5min; 94 ℃/30 s, 58 ℃/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(马铃薯斑纹片病菌)、阴性对照(健康马铃薯叶片)和空白对照(以蒸馏水代替模板 DNA)。

D.2 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 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的紫外投射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

D.3 结果判定

PCR 扩增产物检测,阳性对照出现一条 580 bp 的 DNA 片段,阴性对照和空白对照没有该核酸条带,待检样品如出现 580 bp 的 DNA 片段为检测结果阳性,如未出现 580 bp 的 DNA 片段为检测结果阴性。

附 录 E

(规范性附录)

实时荧光 PCR 方法

E.1 荧光 PCR 检测

LsoF (5'-gtcgagcgcttatttttaatagga-3')/HLBr (5'-gcgttatcccgtagaaaaaggtag-3')和探针 HLBP(5'-FAM-agacgggtgagtaacgcg-BHQ-3')。PCR 反应程序：95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,58 ℃ 1 min,循环 40 次。反应体系见表 E.1。

表 E.1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	浓度	加样量/ μ L
PCR buffer(含 25 mmol/L $MgSO_4$)	10 $\times$	2.5
dNTP	各 2.5 mmol/L	2.0
正义引物	10 μ mol/L	1.0
反义引物	10 μ mol/L	1.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ μ L	0.5
探针	10 μ mol/L	1.0
DNA 模板	$\geq$ 50 ng/ μ L	1.0
ddH ₂ O		补至 25 μ L

E.2 结果判定

实时荧光检测,阳性对照 Ct 值 $\leq$ 30,阴性对照和空白对照没有扩增或 Ct 值 $>$ 40;样品 Ct 值 $\leq$ 35 为阳性;若在 35 与 40 之间,需重复试验,重复结果 Ct 值仍在 35 与 40 之间,判为阳性,否则判为阴性;样品无扩增或 Ct 值 $>$ 40,为阴性。

参 考 文 献

- [1] Alfaro-Fernándezm A, Cebrián M C, Villaescusa F J, et al. First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot in mainland Spain [J]. Plant Disease, 2012, 96(4): 582.
 - [2] EPPO. First report of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ on carrot in France, in association with *Trioza apicalis*. EPPO Reporting Service-Pests and Diseases, 2012, 10. 9-10.
 - [3] Liefting L W, Sutherland P W, Ward L I, et al. A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species associated with diseases of solanaceous crops [J]. Plant Disease, 2009, 93(3): 208-214.
 - [4] Liefting L W, Veerakone S, Ward L I, et al. First report of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ in potato [J]. Plant Disease, 2009, 93(9): 969.
 - [5] Munyaneza J E, Crosslin J M, Upton J E. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with zebra chip, a new potato disease in southwestern United States and Mexico [J]. Journal of Economic Entomology, 2007, 100(3): 656-663.
 - [6] Munyaneza J E. Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management [J]. American Journal of Potato Research. 2012, 89(5): 329-350.
 - [7] Munyaneza J E. Zebra chip disease, *Candidatus Liberibacter*, and potato psyllid: A global threat to the potato industry [J]. American Journal of Potato Research, 2015, 92(2): 230-235.
-