

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3446—2012

澳大利亚植原体候选种检疫鉴定方法

Detection and identification of *Candidatus phytoplasma Australiense*

2012-12-12 发布

2013-07-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、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：牟海青、赵文军、张京宣、王仁睿、朱水芳、段胜男、王有福。

澳大利亚植原体候选种检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了澳大利亚植原体候选种的检疫鉴定方法。

本标准适用于澳大利亚植原体候选种寄主种苗中的澳大利亚植原体候选种的检疫和鉴定。

2 原理

2.1 分类地位

澳大利亚植原体候选种(*candidatus phytoplasma australiense*), 软壁菌门(Tenericutes), 柔膜菌纲(Mollicutes), 菌原体目(Mycoplasmatales), 非醇原体科(Acholeplasmataceae), 植原体候选属(*candidatus phytoplasma*), 16SrX II 组植原体。

2.2 检测依据

本标准主要采用形态生物学特性与分子生物学技术相结合的方法对澳大利亚植原体候选种进行检测鉴定。

对植物材料进行症状观察, 发现有丛枝、黄化、红叶、卷曲等症状则进行进一步的检测; DAPI 荧光染色方法可以作为初步检测植原体的方法; PCR 技术结合 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 技术结合作为鉴定澳大利亚植原体候选种的准确方法; 电子显微镜观察可以清晰、直观地观察到植原体粒体形态。

3 器材与试剂

3.1 仪器

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、荧光显微镜、电子显微镜。

3.2 试剂

DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)、PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP、Taq DNA 聚合酶、引物等。

4 检测与鉴定方法

4.1 症状观察

仔细观察种苗是否表现植原体侵染症状, 症状描述参见附录 A. 1。

4.2 DAPI 染色

选取幼嫩组织(新叶叶梗, 枝梢, 茎杆及根部韧皮部组织), 切片, 用 1 μg/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