

ICS 65.020

B15

# 团体标准

T/CI XXX-2021

低纬高原甘蔗白叶病病原检测与抗病性鉴定技术规程

Technical specifications for pathogen detection and disease  
resistance identification of sugarcane white leaf disease in low  
latitude plateau

(征求意见稿)

2022-X-XX 发布

2022-X-XX 实施

中国国际科技促进会 发布

# 目 录

前 言.....	2
低纬高原甘蔗白叶病病原检测与抗病性鉴定技术规程.....	3
1 适用范围.....	3
2 引用标准.....	3
3 术语定义.....	3
4 缩略语.....	3
5 症状及流行特点.....	4
6 病原检测.....	4
6.1 仪器与器材.....	4
6.2 试剂.....	4
6.3 采样及样品处理.....	5
6.4 DNA 提取.....	5
6.5 巢式 PCR 检测.....	5
6.6 结果判定.....	5
7 抗病性鉴定.....	6
7.1 材料选择与处理.....	6
7.2 接种病原.....	6
7.3 接种液制备.....	6
7.4 接种方法.....	7
7.5 病情调查.....	8
7.6 抗病性评价.....	8
附 录 A （资料性附录） 甘蔗白叶病症状及流行特点.....	10
A.1 甘蔗白病症状.....	10
A.2 甘蔗白叶病流行特点.....	10
附 录 B.....	11
附 录 C.....	12
（规范性附录）.....	12
巢式 PCR 检测操作方法.....	12
表 C.1 巢式 PCR 反应混合液 (25 $\mu$ L 体系).....	12
表 C.2 巢式 PCR 反应混合液 (25 $\mu$ L 体系).....	12
A .....	13

## 前 言

本指南按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》起草。

本标准由中国国际科技促进会标准化工作委员会提出。

本标准由中国国际科技促进会归口。

本标准由云南省农业科学院甘蔗研究所、临沧南华糖业有限公司、保山市农业技术推广中心、耿马南华糖业有限公司、临沧市甘蔗技术推广站、澜沧县甘蔗技术推广站、西盟县经济作物工作站负责起草。

本标准主要起草人：黄应昆、李文凤、李婕、卢文洁、王晓燕、代光伟、段兆祜、单红丽、张荣跃、董有波、黄丕忠、李银焮、罗志坚、南云刚、李茅苗、岩文、石红军、唐吉昌、鲁宾、段明雄、白升伟、林文根、董显华、周中、施永祥、者林成、李文富。

本标准是首次发布。

# 低纬高原甘蔗白叶病病原检测与抗病性鉴定技术规程

## 1 适用范围

本标准规定了低纬高原甘蔗白叶病病原检测与抗病性鉴定的术语定义、缩略语、症状及流行特点、病原检测与抗病性鉴定的技术方法和标准。

本标准适用于甘蔗白叶病的分子检测和甘蔗种质资源对甘蔗白叶病抗病性的人工接种鉴定与评价。

## 2 引用标准

下列文件中的条款，通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 28067 甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

## 3 术语定义

**3.1 巢式 PCR:** 巢式 PCR 是一种使用两对 PCR 引物扩增完整的片段，第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似，第二对引物结合在第一次 PCR 产物内部，使得二次 PCR 扩增灵敏度高于一次 PCR 扩增的变异聚合酶链反应。

**3.2 甘蔗白叶病 (Sugarcane white leaf, SCWL):** 由甘蔗白叶病植原体 (*Sugarcane white leaf phytoplasma*) 系统性侵染甘蔗使蔗叶上出现单条或数条白色条纹甚至全叶变成白色叶质柔软, 病株分蘖增多并矮缩的一种种传植原体病害。

## 4 缩略语

bp: 碱基对(base pair)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide)

dNTPs: 脱氧核苷三磷酸混合液 (Deoxyribonucleoside Triphosphates mixture)

ddH<sub>2</sub>O: 双蒸水

EDTA: 乙二胺四乙酸(Edetate Disodium)

PCR: 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

Tris: 三羟甲基氨基甲烷 (Hydroxymethyl Methyl Aminomethane)

## 5 症状及流行特点

甘蔗白叶病症状及流行特点参见附录 A。

## 6 病原检测

### 6.1 仪器与器材

仪器与器材包括台式离心机、小型离心机、微量可调移液器、恒温水浴锅、旋涡混匀仪、核酸蛋白分析仪、PCR 扩增仪、电泳槽、电泳仪等电泳装置、凝胶成像仪、冰箱(温控范围 4°C和-20°C)、高压灭菌锅、鼓风干燥箱、液氮罐、电子天平、带滤芯移液头、PCR 反应管等。

### 6.2 试剂

除另有规定外, 所用试剂均为分析纯。

#### 6.2.1 DNA 提取试剂

DNA 提取试剂及配制方法见附录 B。

## 6.2.2 PCR 试剂

PCR 试剂及配制方法参见附录 B。

## 6.2.3 电泳缓冲液

储存液为 50 倍 TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 B，工作液用 ddH<sub>2</sub>O 将储存液稀释 50 倍后获得。

## 6.2.4 扩增产物检测试剂

琼脂糖、Goldenvue 核酸染料、6 倍上样缓冲液、DNA 分子量标准。

## 6.3 采样及样品处理

### 6.3.1 采样工具

采样工具处理按照 GB/T 28067 的要求执行。

### 6.3.2 采样方法

采样方法参照 GB/T28067 的要求执行。其中，叶片样品采集时首选疑似甘蔗白叶病病株，具体参见附录 A，样品独立分装，编号备用。

### 6.3.3 样品保存

样品存放与运送按照 GB/T 28067 要求执行。

## 6.4 DNA 提取

DNA 提取方法参见附录 B。

## 6.5 巢式 PCR 检测

巢式 PCR 检测方法参见附录 C。

## 6.6 结果判定

阳性对照有条带，阴性对照和空白对照无条带时，检测结果有效，当检测结果有效时，依据表 1 进行结果判定。

表 1 判定表

目的条带大小 (bp)	样品	阳性对照	阴性对照	空白对照	结果判定
1240	有	有	无	无	含白叶病植原体
1240	无	有	无	无	不含白叶病植原体

## 7 抗病性鉴定

### 7.1 材料选择与处理

#### 7.1.1 材料选择

选择经 Nest-PCR 检测不带 SCWL 植原体的健壮蔗株。

#### 7.1.2 对照材料

鉴定材料中加入甘蔗品种粤糖 86-368、新台糖 25 号作感病对照, 粤糖 83-88、云蔗 05-51 作抗病对照。

#### 7.1.3 材料处理

分别切成双芽段, 在流动冷水中浸泡 48 h 之后, 用  $(50\pm 0.5)$  °C 热水处理 2 h, 再用 70% 噻虫嗪水分散剂和 50% 多菌灵可湿性粉剂 1: 800 液浸种 5 min ~ 10 min。

#### 7.1.4 土壤准备

土壤经高温蒸煮消毒后, 按消毒土壤和有机肥 (3: 1) 混匀, 装入 ( $\phi 35$  cm  $\times$  高 30 cm) 塑料桶内, 装入量为桶容量的三分之二。

### 7.2 接种病原

从甘蔗白叶病发病区域选择具典型白叶病症状的高感品种粤糖 86-368 蔗株, 经巢式 PCR 检测筛选含 SCWL 植原体的蔗茎作接种病原。

### 7.3 接种液制备

接种前通过压榨作接种病原的蔗茎获取携带 SCWL 植原体蔗汁，加入为携带 SCWL 植原体蔗汁体积 10 倍量的无菌水稀释混匀，用双层纱布过滤，滤液即为 SCWL 植原体接种液，现配现用。

## **7.4 接种方法**

### **7.4.1 接种方法选择**

接种方法可选用包衣接种法或切茎接种法。

### **7.4.2 包衣接种法**

#### **7.4.2.1 包衣接种**

处理好的蔗种置于塑料膜表面，按 1000 kg 处理好的蔗种用 15 kg 接种液的比例，采用电动喷雾器将接种液均匀喷洒置于塑料膜表面的蔗种，边喷边翻动蔗种，喷完后将该塑料膜的一半覆盖蔗种，于 25℃ 下保湿 24 h。

#### **7.4.2.2 材料种植**

接种后的供试材料分别种植在塑料桶内，每份供试材料种植 4 桶，4 次重复，每桶种植 8 芽，共 32 芽，置于 20℃ ~ 30℃ 抗病虫鉴定防虫温室中培养。

### **7.4.3 切茎接种法**

#### **7.4.3.1 材料种植**

处理后的供试材料分别种植在塑料桶内，每份供试材料种植 4 桶，4 次重复，每桶种植 8 芽，共 32 芽，置于 20℃ ~ 30℃ 抗病虫鉴定防虫温室中培养。接种时每桶选择长势较一致的 8 株，共 32 株。

#### **7.4.3.2 切茎接种**

供试材料 6 月株龄时，在阴天的傍晚用灭菌锋利切刀（或枝剪）把供试材料



植株地上部分沿土表快速切去，用移液枪将 100 μL SCWL 植原体接种液滴入蔗株根部切口上，每份供试材料接种 32 株，遮光 24 h。接种后置于 20°C ~ 30°C 抗病虫鉴定防虫温室中培养观察。

## 7.5 病情调查

包衣接种 30 d 和切茎接种 20 d 后，调查各供试材料发病株率，以后每隔 15 d 调查 1 次，直至感病对照品种发病株率稳定为止。记录接种日期、接种芽(株)数、出苗数、病害症状始现期、累计发病株数。

计算公式：

累计发病株率 (%) 按公式 (1) 计算：

$$BP = sn1/sn2 \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：BP——累计发病株率 (%)

sn1——累计发病株数

sn2——累计总株数

## 7.6 抗病性评价

按以下分级标准进行抗病性评价，见表 2。

表 2 甘蔗抗白叶病鉴定评价标准

级别	发病率%	抗病性
1 级	0-3.0	高抗(HR)
2 级	3.1-10.0	抗病(R)
3 级	10.1-20.0	中抗(MR)
4 级	20.1-40.0	感病(S)

5级	40.1-100	高感(HS)
----	----------	--------

征求意见稿

## 附录 A

(资料性附录)

### 甘蔗白叶病症状及流行特点

#### A.1 甘蔗白病症状

甘蔗白叶病症状类型可归纳为白叶型和草苗型两类。白叶型病株叶片表现为叶质柔软，叶绿素含量减少而白化。有的整叶白化，有的呈条纹状白化，有的呈斑驳状白化。草苗型病株茎部现白色长条纹，分蘖明显增多，病株矮缩，茎细，节间缩短，顶部叶片丛生，外观如草苗。草苗型病株和白叶型病株常混合出现，这种混合型病株最容易枯死，即使成活也常不成茎。仅叶片白化而无分蘖过多的病株虽可枯死，但不枯死的病株可恢复，有的恢复比例也较高，有的甚至恢复到与健株外观难以区别，但到宿根蔗又再现典型症状，见图 A.1。



图 A.1 甘蔗白叶病症状

A: 病叶; B: 病株; C: 病丛; D: 病田

#### A.2 甘蔗白叶病流行特点

甘蔗白叶病(Sugarcane white leaf, SCWL)是由 16Sr XI 组中的甘蔗白叶病植原体 (*Sugarcane white leaf phytoplasma*) 引起的一种检疫性甘蔗重要病害。SCWL 植原体为无细胞壁原核微生物，尚不能在人工培养基离体培养，潜育期较长，最短的约为 30 天(少数)，一般为 2~3 个月，有的甚至长达一年之久。寄主主要有甘蔗 (Sugarcane)、百慕大草 (Bermuda grass)。

SCWL 植原体存在于病株韧皮部筛管中，甘蔗是无性繁殖作物，SCWL 可通过带病蔗种进行远距离传播，且传播性极强。此外，SCWL 在田间还可通过细针叶蝉 *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura 和条纹闭颜叶蝉 *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura 传播。用病蔗留种，特别是基部数节留种，长出的幼苗几乎全为病苗，萌发后 1 个月左右就死亡。病害的发生受品种抗性，种蔗带毒率、传毒虫媒叶蝉的数量及环境条件等诸因素的影响。如品种高度感病，种蔗带毒率高，加上环境条件又有利于介体昆虫的繁殖和传毒活动，则病害往往发生较重，反之则发生较轻。宿根蔗一般比新植蔗发病重。

附录 B  
(规范性附录)  
试剂配制和 DNA 提取

B.1 DNA 提取试剂配制

DNA 提取试剂配制方法见表 B.1。

表 A.1 2 倍 CTAB 抽提缓冲液

组分	配制量 (L)	配制方法
1.0 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl(pH8.0)母液	1	称取 121.0g Tris, 溶解于 800 mL 的 ddH <sub>2</sub> O 中, 用 6 mol·L <sup>-1</sup> 的 HCl 调节 pH 至 8.0 后, 用 ddH <sub>2</sub> O 定容到 1.0L。
0.5 mol·L <sup>-1</sup> EDTA(pH8.0)的母液	1	称取 186.0g Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O, 加入 800 mL ddH <sub>2</sub> O, 充分搅拌, 用 2 mol·L <sup>-1</sup> 的 NaOH 调节 pH 至 8.0 后, 用 ddH <sub>2</sub> O 定容到 1.0L。
2 倍 CTAB 抽提缓冲液	1	依次加入 20g 的 CTAB 粉末, 100 mL 的 1.0 mol·L <sup>-1</sup> 的 Tris-HCl(pH 8.0)母液, 40 mL 的 0.5 mol·L <sup>-1</sup> 的 EDTA(pH8.0)的母液, 81.8 g 的 NaCl, 用灭菌双蒸定容到 1.0L。

B.2 DNA 提取

DNA 提取方法如下:

- a) 取数支 1.5 mL 无 DNA 酶的 Eppendorf 管, 1 管阳性对照、1 管阴性对照, 对每个管进行编号。
- b) 称取 0.2 g 新鲜叶片样品剪细, 加液氮充分研磨成粉末状后, 转入 2.0 mL 灭菌离心管。
- c) 立即加入 1.0 mL 预热 (约 65°C) 的 2 倍 CTAB 抽提缓冲液, 震荡混匀, 65°C 水浴 30 min, 室温 12,000 rpm 离心 10 min。
- d) 取上清加等体积的氯仿/异戊醇(V/V=24:1), 剧烈振荡混匀, 室温 12,000 rpm 离心 10 min。
- e) 取 750 μL 上清至另一新的灭菌离心管中, 加 2/3 体积异丙醇, 颠倒混匀, -20°C 放置 1 h, 12000 rpm 离心 10 min。
- f) 沉淀加入 70%乙醇 500 μL, 12000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 沉淀于室温下 1.5 mL 灭菌离心管风干, 溶于 50 μL ddH<sub>2</sub>O。
- g) 用核酸蛋白分析仪测定波长 260 nm 和 280 nm 处吸光值, 当 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在 1.8~2.0 之间时, 将样品于 -20°C 保存备用。

附录 C  
(规范性附录)  
巢式 PCR 检测操作方法

C.1 扩增试剂配制

PCR 扩增试剂配制方法如下。

C.1.1 巢式第一次 PCR 反应混合液

巢式第一次 PCR 反应混合液配制见表 C.1。

表 C.1 巢式 PCR 反应混合液 (25  $\mu\text{L}$  体系)

组 分	使用量 ( $\mu\text{L}$ )	终浓度
DNA	1.0	-
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游引物 P1	1.0	0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下游引物 P7	1.0	0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
10 倍 PCR 缓冲液	2.5	1 倍
25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$	2.0	0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{dNTPs}$	2.0	0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ <i>Taq</i> 酶	0.2	0.32 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
ddH <sub>2</sub> O	15.3	-

C.1.2 巢式第二次 PCR 反应混合液

巢式第一次 PCR 反应混合液配制见表 C.2。

表 C.2 巢式 PCR 反应混合液 (25  $\mu\text{L}$  体系)

组 分	使用量 ( $\mu\text{L}$ )	终浓度
DNA	1.0	-
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游引物 R16F2n	1.0	0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下游引物 R16R2	1.0	0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
10 倍 PCR 缓冲液	2.5	1 倍
25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$	2.0	0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{dNTPs}$	2.0	0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ <i>Taq</i> 酶	0.2	0.32 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
ddH <sub>2</sub> O	15.3	-

C.2 对照

阳性对照：确认含甘蔗白叶病植原体样品的 DNA 做阳性对照。

阴性对照：确认不含甘蔗白叶病植原体样品的 DNA 做阴性对照。

空白对照：用等体积 ddH<sub>2</sub>O 替代样品做空白对照。

C.3 引物

C.3.1 引物序列

巢式第一次 PCR 上游引物 P1: 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3', 下游引物 P7: 5'-CGTCCTTCATCGGCTCCT-3'。

巢式第二次 PCR 上游引物 R16F2n: 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3', 下游引物 R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'。

C.3.2 引物的配制

上述巢式 PCR 引物用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至浓度为 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

C.4 巢式 PCR 扩增

C.4.1 巢式 PCR 体系配制

巢式 PCR 体系配制方法如下：

a) 在冰上融化各反应试剂组分，瞬间低速离心（2,000 rpm 下离心 3 s~5 s），加入阳性对照、阴性对照和空白对照。根据测试样品数量，计算各试剂使用量，每份样品设置 2 个平行反应。

b) 第一次 PCR 反应：25  $\mu$ L PCR 反应体系，按表 C.1 依次加入反应试剂，瞬间低速离心混匀。

c) 第二次 PCR 反应：取第一次 PCR 扩增产物稀释 30 倍，取 1.0  $\mu$ L 作扩增模板，按表 C.2 依次加入反应试剂，瞬间低速离心混匀。

#### C. 4. 2 巢式 PCR 扩增程序

在 Bio-Rad C1000 PCR 扩增仪上进行扩增，巢式 PCR 扩增程序如下：

a) 第一次 PCR 反应程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min；94 $^{\circ}$ C 变性 30s，55 $^{\circ}$ C 退火 60s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

b) 第二次反应程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30s，57 $^{\circ}$ C 退火 30s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

#### C. 5 琼脂糖电泳检测与凝胶成像分析

琼脂糖电泳检测与凝胶成像分析方法如下：

a) 配制浓度为 1.5% (W/V) 的琼脂糖凝胶（即 1 倍 TAE 电泳缓冲液 100mL 加 1.5g 琼脂糖），加热融化混匀，冷却至 60 $^{\circ}$ C 左右，加入浓度为 0.005% Goldenvue 核酸染料（按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5  $\mu$ L 核酸染料溶液的比例），混匀后倒入胶槽，插上样品梳。

b) 室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳，将琼脂糖凝胶和胶板置于电泳槽中，使样本孔位于电场负极，向电泳槽中加入 1 倍 TAE 电泳缓冲液。

c) 取 10  $\mu$ L PCR 反应产物，加 2  $\mu$ L 上样缓冲液并混匀，然后依次将 DNA 分子量标准、检测样品、阳性对照、阴性对照、空白对照上样到点样孔中。电泳电压为 130 V，当上样缓冲液中的溴酚蓝条带迁移至凝胶 1/2 的位置，停止电泳。

d) 取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪成像拍照、保存。