

本诊断规程于 2016 年 1 月由标准委员会代表植物检疫措施委员会通过。

本附件为 ISPM 27 标准规定的一部分。

# ISPM 27

## 限定有害生物诊断规程

### DP 12: 植原体 (Phytoplasmas)

2016 年通过 ; 2016 年出台

#### 目录

1. 有害生物信息 .....	2
2. 分类信息 .....	3
3. 检测与鉴定 .....	3
3.1 常规巢式 PCR .....	5
3.2 实时 PCR .....	6
3.3 分子检测的对照 .....	7
3.4 PCR 结果的解释 .....	8
3.4.1 常规巢式 PCR .....	8
3.4.2 实时 PCR .....	8
3.5 序列分析 .....	8
4. 记录 .....	9
5. 获取进一步信息的联络点 .....	9
6. 致谢 .....	9
7. 参考文献 .....	10

## 1. 有害生物信息

植原体最初由 Doi 等（1967）在寻找紫苑属植物黄化因子时发现。由于在形态上与动物支原体相似，而且对四环素类抗生素敏感，这些单细胞生物被称为类支原体生物（Ishii 等，1967）。植原体是专性原核植物病原物，没有细胞壁，它们形态多变，平均直径为 200–800 nm。它们定殖在寄主植物的韧皮部筛管细胞中。植原体基因组大小介于 550 至 1 500 kb 之间-基因组和其他原核生物相比相对较小 – 它们不具备几种生物合成功能（Marcone 等，1999；Davis 等，2005；Bai 等，2006；Oshima 等，2013）。

植原体和不同种类寄主植物中很多症状有关（Lee 等，2000）。与植原体侵染有关的独特症状包含绿变（形成绿色花朵，失去正常的花色素）、花变叶（花器发育成叶状结构）、簇叶或丛枝（副梢或腋生枝增多）以及其他枝条与根系的不正常增多、叶片黄化、变红和其他类型的变色、叶片和果实变小、韧皮部坏死，以及整株衰退与矮化（Davis 和 Sinclair，1998）。一些种类的植物可耐受或抵抗植原体侵染；这些植物受侵染后可能不表现症状或仅表现出轻微的症状（Lee 等，2000）。

Seemüller 等（2002）估计约有 1000 种植物可受植原体危害。多数植原体寄主为双子叶植物。在单子叶植物中检测到的植原体比较少；此类寄主主要来自棕榈科（Palmae）和禾本科（Poaceae）（Seemüller 等，2002）。

植原体在世界范围内普遍发生。植原体病害的地理分布与影响取决于植原体的寄主范围，以及昆虫传媒的存在与否和取食行为。一些植原体具有很广的寄主范围和多食性传媒，因而具有广泛的分布。其他一些植原体具有有限的寄主范围和寡食性或单食性昆虫传媒，这会限制其地理分布。对主要植原体分类群的地理分布的综述可参阅 Foissac 和 Wilson（2010）。

植原体可由昆虫传媒、菟丝子和嫁接传播，也可通过受侵染植物部位的无性繁殖扩散。引起植原体多数自然传播的昆虫传媒仅限于取食韧皮部的叶蝉、飞虱和木虱（半翅目（Hemiptera）、头喙亚目（Auchenorrhyncha））。它们持续传播病原。Weintraub 和 Beanland（2006）列出了 90 种已知传媒，其中一些能携带一种以上植原体。植原体其他的传播方式包含菟丝子和接穗传播。菟丝子（菟丝子属（*Cuscuta*）和无根藤属（*Cassytha* spp.）各种植物）是寄生性藤本植物，它们通过吸器与寄主植物建立维管束连结。一旦在健康植物和受植原体侵染的植物之建立起“桥梁”，植原体就会通过韧皮部的连结因子传播给健康植物。接穗传播和植物通过组织培养进行的微体繁殖可用于保存植原体，用于参考目的（IPWG, n.d.）。

包含显示病害症状的照片、昆虫传媒清单和植原体分类数据库等在内的有关植原体的进一步信息可从以下网站获取：COST 行动 FA0807 不同作物系统中植原体病害的综合治理（<http://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/>）与植原体资源中心（<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>）。

## 2. 分类信息

**学名：** Phytoplasma

**异名：** Mycoplasma-like organism (MLO)、mycoplasma

**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” (‘*Candidatus Phytoplasma*’)

比较支原体学国际研究项目 (IRPCM) 植原体/螺原体工作组 – 植原体分类小组已经发表了“植原体属”的种描述指南 (IRPCM, 2004)。对“植原体属”的种的描述基于 16S 核糖体 (r) RNA 基因序列，以及生物学特征。一般而言，种内植原体 16S rRNA 基因的数量  $\geq 1200$  个的核苷酸中相同者  $\geq 97.5\%$ 。当一种“植原体”包含具有不同生物学特性 (传媒与寄主植物) 的植原体时，它们可根据 IRPCM (2004) 发布的具体规则进行分类鉴别。“植原体属”的种的描述发表于 *国际微生物分类进化学杂志*，自 2015 年 3 月以来“植原体属”已描述了 37 个种。

## 3. 检测与鉴定

聚合酶链式反应 (PCR) 技术是选定的植原体检测方法。植原体成功的分子检测取决于对植物组织适当的取样方式和可靠的核酸提取方法 (Palmano, 2001; Firrao 等, 2007)。植原体在植物体内可能分布不均且浓度不匀，在木本寄主中尤其如此，表现出症状的组织最适合用于植原体检测 (Constable 等, 2003; Garcia-Chapa 等, 2003; Christensen 等, 2004; Necas 和 Krska, 2006)。一些寄主植物可能发生无症状的侵染，如怀疑存在这种情况，则对植物不同组织进行全面取样就变得十分重要。

植物寄主中植原体浓度会影响 PCR 检测的可靠性 (Marzachi, 2004)。植原体浓度可受植原体株系或种类、寄主植物种类、侵染时期及气候条件影响。对植物组织进行取样的时间非常重要，因为植原体在植株中的位置和浓度可能会受季节变化的影响 (Seemüller 等, 1984; Jarausch 等, 1999; Berges 等, 2000; Constable 等, 2003; Garcia-Chapa 等, 2003; Prezelj 等, 2012)。

对多数植原体病害而言，表现出症状的叶片是最好的诊断用样品来源。植原体存在于受侵染植物的韧皮部筛管组织中，因此叶柄和中脉、茎或内皮常用于 DNA 提取。在一些情况下 (例如 X-病植原体)，果柄中植原体浓度最高 (Kirkpatrick, 1991)。尽管可以在休眠树木的根部和树皮刮屑中检测到植原体，但一般而言最好在夏末对植原体进行检测。采集到的植物样品检测前可在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存 6 个月。要保存更长时间，可置于  $-80^{\circ}\text{C}$  下，或对植物材料进行冻干，或用氯化钙干燥并保存在  $4^{\circ}\text{C}$  下。

已报道植原体 PCR 检测可使用不同的核酸提取方法。一些方法在提取核酸前采用一个富集步骤来提高植原体浓度（Kirkpatrick 等，1987；Ahrens 和 Seemüller，1992；Prince 等，1993）。这些技术对诸如多年生木本植物等植原体浓度低的寄主，或从中经常和核酸同时提取到会抑制 PCR 的高水平多糖、多酚等化合物的“困难”寄主有用。在一些简化的方法中，植物组织可直接在市场上购买的裂解缓冲液中，或基于十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）的缓冲液中研磨。通常使用 2% CTAB 缓冲液（已证明 3% 溶液对葡萄藤更为可靠）（Daire 等，1997；Angelini 等，2001）。随后可直接用市场上购买的硅离心柱（Green 等，1999；Palmano，2001），或磁珠（Mehle 等，2013），或有机溶剂（Daire 等，1997；Zhang 等，1998）从裂解液中提取 DNA。使用磁珠的方法一般在一个自动化核酸提取设备（例如 Thermo Scientific<sup>1</sup>生产的 KingFisher）上完成。多数提取方法已通过多种寄主植物得到充分验证。方法的选择取决于待检测的寄主和可供使用的设施设备。实际工作中可针对多年生木本植物使用一种含植原体富集步骤的方法，对草本寄主则可使用一种简化的方法。就常规诊断和一个特定寄主而言，对一种提取方法进行验证对确保可靠性非常重要。

已设计了多种通用 PCR 引物，可对任何已知植原体的 16S rRNA 基因进行扩增。最常用的引物是 P1/P7（Deng 和 Hiruki，1991；Schneider 等，1995）和 R16F2n/R16R2（Lee 等，1993；Gundersen 和 Lee，1996）引物对，它们可在巢式 PCR 规程中使用。P1/P7 引物对扩增的 PCR 产物包含完整的 16S rRNA 基因和 16S/23S rRNA 间隔区。有报道认为，取决于寄主 - 植原体组合，实时 PCR 和巢式 PCR 相比具有相同或更高的灵敏度（Christensen 等，2004），而且因其不要求进行扩增后处理，因而更适用于高通量分析。和常规 PCR，尤其是巢式 PCR 相比，使用 TaqMan 探针的实时 PCR 还有更高的特异性，而且不太可能发生交叉污染。使用本规程推荐的 PCR 分析方法可能因密切相关的细菌产生假阳性 - 这是通用分析方法必须做出的妥协（Fránová，2011；Pilotti 等，2014）。也有可能进行特异性更强的 PCR 分析，或在结果非常重要（例如输入后的检疫样品、新寄主记录、新分布）时，应对常规 PCR 产物进行测序。

和对 16S rRNA 基因进行扩增一样，也可使用 PCR 方法扩增基因组的其他区域来对植原体进行检测和鉴定，包含核糖体蛋白基因（Lim 和 Sears，1992；Jomantiene 等，1998；Lee 等，1998；Martini 等，2007）、*tuf* 基因（Schneider 等，1997；Makarova 等，2012）、23S rRNA 基因（Guo 等，2003）和 *secY* 基因（Lee 等，2010；Davis 等，2013；Quaglino 等，2013）。在要求有植原体基因组的第二个独立区域时，这些引物可能会有用。

---

<sup>1</sup> 在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。此类诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用不意味对它们认可而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

取决于寄主种类和组织的类型、年龄，样品中可能含有对 PCR 有抑制作用的化合物。因此，非常重要的一点是，要使用可扩增寄主植物一段基因的内对照引物来检验 DNA 提取物是否适用于 PCR。寄主的抑制问题可通过使用 sephacryl 离心柱来进一步纯化 DNA，或在 PCR 混合液中加入最终浓度为 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白来解决 (Kreader, 1996)。

在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。此类诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用不意味对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

### 3.1 常规巢式 PCR

本方法第一阶段 PCR 使用的引物为 P1 (Deng 和 Hiruki, 1991) 和 P7 (Schneider 等, 1995)：

P1 (正向)：5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

P7 (反向)：5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

第二阶段 PCR 引物为 R16F2n (Gundersen 和 Lee, 1996) 和 R16R2 (Lee 等, 1993)：

R16F2n (正向)：5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 (反向)：5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

20  $\mu$ l 反应混合液的成分为含 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 的 1 $\times$  Taq DNA 聚合酶缓冲液、0.5  $\mu$ M 各引物、200  $\mu$ M 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs)、1 U Taq DNA 聚合酶和 2  $\mu$ l DNA 模板。扩增条件为一个 94°C 2 min 的预变性步骤，随后 40 个循环的 94°C 30 s、53°C (P1/P7 引物) 或 50°C (R16F2n/R16R2 引物) 30 s 与 72°C 1 min，以及一个 72°C 10 min 的最后延伸步骤。对巢式 PCR 而言，使用 1  $\mu$ l 未经稀释或按 1:30 比例稀释的第一阶段产物作为第二阶段 PCR 的模板。PCR 产物用凝胶电泳分析。P1/P7 和 R16F2n/R16R2 引物分别产生 1800 个碱基对 (bp) 和 1250 bp 的扩增子。

可使用 Werren 等 (1995) 的通用真核生物 28S rRNA 基因引物来确认提取物中含有适用于 PCR 的 DNA：

28Sf (正向)：5'-CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC-3'

28Sr (反向)：5'-AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC-3'

28S rRNA 分析法所用的反应混合液含有和植原体分析法同样的成分，而且在同样的条件下循环，因此两种分析可以在不同的试管内同时进行。28Sf/28Sr 引物对产生一个 500–600 bp 的扩增子。

其他引物对也可用于检查 DNA 是否适用于 PCR。

### 3.2 实时 PCR

实时 PCR 采用 Christensen 等（2004）设计用于 16S rRNA 基因的 TaqMan 分析法来进行：

正向引物：5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'

反向引物：5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'

TaqMan 探针：5'-FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ-3'

也可采用 Hodgetts 等（2009）设计用于 23S rRNA 基因的实时 PCR：

JH-F 1（正向引物）：5'-GGT CTC CGA ATG GGA AAA CC-3'

JH-F 全部（正向引物）：5'-ATT TCC GAA TGG GGC AAC C-3'

JH-R（反向引物）：5'-CTC GTC ACT ACT ACC RGA ATC GTT ATT AC-3'

JH-P 通用（TaqMan 探针）：5'-FAM-MGB-AAC TGA AAT ATC TAA GTA AC-BHQ-3'

25  $\mu$ l 反应混合液含 1 $\times$ TaqMan 实时 PCR 混合母液、300 nM 正向引物、300 nM 反向引物、100 nM FAM 探针和 2  $\mu$ l DNA 模板。所有样品均重复检测。扩增条件为：一个 95 $^{\circ}$ C 3 min 的预变性步骤，随后进行 40 个循环的 95 $^{\circ}$ C 15 s 与 60 $^{\circ}$ C 1 min。这些循环条件可根据所使用的混合母液的类型而改变（例如一些混合母液要求有一个 95 $^{\circ}$ C 10 min 的聚合酶激活步骤，又如含尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）的混合母液要求一个最初的 50 $^{\circ}$ C 2 min 保持步骤）。实时 PCR 的结果使用和设备一起提供的生产商软件进行分析。

Christensen 等（2004）的实时 PCR 分析法使用 900 nM 反向引物，后来的报道（Christensen 等，2013）将其更新为 300 nM。本分析法使用任一浓度的反向引物都可以同样正常地工作。

16S rRNA 实时 PCR 方法已通过检测来自 18 个亚群的植原体做过评估，结果显示取决于不同的寄主 - 植原体组合，该方法和常规巢式 PCR 同样灵敏，或比后者灵敏 10 倍（Christensen 等，2004）。一项 22 个实验室参与的检测果树植原体的环形试验显示，Christensen 等（2004）和 Hodgetts 等（2009）的方法在灵敏度和特异性方面相近（EUPHRESO FruitPhytoInterlab Group, 2011）。

可使用 Werren 等（2000）的 COX 分析法来确认提取物中含有适用于 PCR 的 DNA，它扩增细胞色素氧化酶基因：

COX-F（正向）：5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-R（反向）：5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'

COX-P（TaqMan 探针）：5'-FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-BHQ-3'

另外，Christensen 等（2004）的 18S rRNA 基因分析法也可用于确认 DNA 是否适用于 PCR，而且建议用于 COX 分析法效率不高的单子叶植物：

正向引物：5'-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3'

反向引物：5'-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3'

TaqMan 探针：5'-FAM-ACA CAC CGC CCG TCG CTC C-BHQ-3'

COX 和 18S rRNA 基因分析法所用的反应混合液含有和植原体实时分析法同样的成分，而且在同样的条件下循环，因此两种分析可以在不同的试管内同时进行。另外，如果探针用不同的报告荧光基团标记，而且对引物和探针的浓度进行过优化，可防止低水平植原体被用作内对照的高水平植物 DNA 淹没时，内对照分析可和植原体分析可在同一个试管内复合进行。

### 3.3 分子检测的对照

为确保获得可靠的检测结果，取决于所采用的检测类型和所要求的确定性水平，应考虑为每组核酸分离和目标有害生物核酸的扩增设立适宜的对照。对 PCR 而言，至少应使用一个阳性核酸对照、一个内对照和一个阴性扩增对照（无模板对照）。

**阳性核酸对照。**本对照用于监测检测方法（提取过程除外），特别是扩增的效率。可使用从受感染植物中提取的 DNA、完整的基因组扩增 DNA 或一种合成对照物（例如克隆的 PCR 产物）。

**内对照。**对常规和实时 PCR 而言，应在规程中采用一个诸如通用真核生物 28S rRNA 基因（其在常规巢式 PCR 中的使用参看 3.1 节）或 COX 基因（其在实时 PCR 中的使用参看 3.2 节）的植物管家基因，以排除因核酸提取失败或降解，或存在 PCR 抑制剂而导致 PCR 假阴性的可能。

**阴性扩增对照（无模板对照）。**常规和实时 PCR 必需采用本对照来排除制备反应混合液过程中污染导致的假阳性。可在扩增阶段加入制备反应混合液所用的 PCR 级水。

**阳性提取对照。**本对照用于确保植原体核酸的数量和质量足以满足 PCR 需要，可以检测到病原体。从受感染寄主组织或用植原体接种过的健康植物组织中提取植原体 DNA。

阳性对照应约为每株植物用于 DNA 提取的叶片组织数量的 1/10。如果混合样品，阳性对照的数量应相应调整（例如 10 份 20 mg 样品混合用于 DNA 提取，则使用 2 mg 受感染叶片+ 198 mg 健康植物组织）。如果未检测到阳性对照，则应重复进行检测，或降低混合率直至得到可靠的检测。

对 PCR 而言，应注意避免阳性对照或阳性样品的气雾引起的交叉污染。应对实验室使用的阳性对照进行测序，以便随时将该序列与来自具有正确大小的 PCR

扩增子的序列进行比较。另外，合成阳性对照可根据一个已知序列制作，因而也可以与具有正确大小的 PCR 扩增子进行比较。

**阴性提取对照。**本对照用于监测核酸提取过程中的污染和/或与寄主组织的交叉反应。本对照可以是提取缓冲液，或者含有从未受侵染的寄主组织中提取并随后进行过扩增的核酸。在预期可能存在大量阳性样品的情况下，建议在检测样品中包含阴性提取对照。

### 3.4 PCR 结果的解释

#### 3.4.1 常规巢式 PCR

病原特异性 PCR 可判为有效，如果：

- 阳性对照产生目标病原正确大小的扩增子
- 阴性提取物对照和阴性扩增对照不产生目标病原正确大小的扩增子。

就以植物 DNA 为目标的内对照而言，健康对照（如有使用）、阳性对照和每个检测样品必须产生预期大小的扩增子。样品使用内对照引物不能扩增说明发生了 DNA 提取失败、反应混合液未加入核酸、DNA 提取物中有抑制 PCR 的化合物，或 DNA 已经降解等情况。

样品检测可判为阳性，如果它产生了正确大小的扩增子。为鉴定阳性样品中存在的植原体，需要对扩增子进行测序（见 3.5 节）。在一些情况下，可采用更具特异性的 PCR 分析法。

#### 3.4.2 实时 PCR

实时 PCR 可确定一个样品对植原体是阳性还是阴性。为鉴定阳性样品中存在的植原体，需要通过常规 PCR 获得产自 R16F2n/R16R2 引物对的至少长 1 250 bp 的 16S rRNA 基因，用于序列分析（见 3.5 节）。另外，对一些植原体而言，有可能使用特异性实时 PCR 分析；例如 16SrX（苹果丛枝病）群（Torres 等，2005）和葡萄金黄化病（*flavescence dorée*）（Pelletier 等，2009）。

### 3.5 序列分析

PCR 产物应直接或先将其克隆进一个 PCR 克隆载体来进行测序。序列数据可使用国家生物技术信息中心（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）提供的基本局部相似性比对搜索工具（BLASTN）进行分析。如果序列与其关系最近的种之间的一致性小于 97.5%，则可认为该植原体是植原体属的一个新种。在此情况下，应对整个 16S rRNA 进行测序，并进行系统发育分析。最好还对一个诸如 16S/23S rRNA 间隔区、*secY* 基因、核糖体蛋白基因或 *tuf* 基因等的分离的基因组区域进行测序。



## 4. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）的要求保存记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果影响的情况下，特别是在出现违规或一个地区首次发现一种植原体时，以下记录、证据和其他材料应至少妥善保存 1 年，以确保可追溯性：

- 最初的样品，在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下冷冻、冻干或用氯化钙干燥并保存在 $4^{\circ}\text{C}$ 下。
- 如有必要，DNA 提取物应在 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存。滴加到膜上的植物提取物应在室温下保存。
- 如有必要，PCR 扩增产物应在 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存。

## 5. 获取进一步信息的联络点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

初级产业部植物健康与环境实验室，新西兰奥克兰 1140 号，2095 号邮政信箱  
(Lia W. Liefiting; 电子邮件: [lia.liefiting@mpi.govt.nz](mailto:lia.liefiting@mpi.govt.nz);  
电话: +64 9 9095726; 传真: +64 9 9095739)。

维多利亚经济发展、就业、运输与资源部，澳大利亚，VIC 3083，Bundoora  
区 5 环路农业生物学科学中心 (AgriBio) (Fiona Constable; 电子邮件:  
[fiona.constable@ecodev.vic.gov.au](mailto:fiona.constable@ecodev.vic.gov.au); 电话: +61 3 9032 7326;  
传真: +61 3 9032 7604)。

领土与可持续部，西班牙巴塞罗那 0829，Diagonal 大街 525 号  
(Ester Torres; 电子邮件: [ester.torres@gencat.net](mailto:ester.torres@gencat.net))。

植物保护与水果类作物研究所联邦农业与林业生物研究中心，德国多森海姆市  
D-69221，Schwabenheimer 大街 101 号 (Wilhelm Jelkmann;  
电子邮件: [wilhelm.jelkmann@jki.bund.de](mailto:wilhelm.jelkmann@jki.bund.de))。

国家植物保护组织 (NPPOs)、区域植物保护组织 (RPPOs) 或植物检疫措施委员会 (CPM) 附属机构可通过国际植物保护公约秘书处 ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)) 提出对诊断规程进行修订的申请，此类申请会被转交给诊断规程技术小组 (TPDP)。

## 6. 致谢

本规程由 L.W. Liefiting (新西兰初级产业部植物健康与环境实验室 (参看前节))、P. Jones (英国洛桑研究所植物病原互作部)、F. Constable (澳大利亚维多利亚经济发展、就业、运输与资源部 (参看前节))、E. Torres (西班牙巴塞罗那领土与可持续部 (参看前节))、W. Jelkmann (德国植物保护与水果类作物研究所联邦农业与林业生物研究中心 (参看前节)) 和 J. Verhoeven (荷兰瓦赫宁根植物保护局诊断部) 起草。

## 7. 参考文献

本附件可引自国际植物检疫措施标准（ISPMs）。ISPMs 可从国际植物检疫门户网站（IPP）获取：<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm>。

- Ahrens, U. & Seemüller, E.** 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. & Boudon-Padieu, E.** 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. & Hogenhout, S.A.** 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E.** 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145–1152.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schulz, A.** 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175–1184.
- Christensen, N.M., Nyskjold, H. & Nicolaisen, M.** 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 245–252. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Constable, F.E., Gibb, K.S. & Symons, R.H.** 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276.
- Daire, X.D., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E.** 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.
- Davis, R.E., Jomantiene, R. & Zhao, Y.** 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832–840.
- Davis, R.E. & Sinclair, W.A.** 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.
- Davis, R.E., Zhao, Y., Dally, E.L., Lee, I.M., Jomantiene, R. & Douglas S.M.** 2013. ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766–776.
- Deng, S. & Hiruki, C.** 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.
- Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Mycoplasma or PLT-group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches’ broom, aster yellows and paulownia witches’ broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266.
- EUPHRESKO FruitPhytoInterlab Group.** 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’: Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281–S284.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. & Marzachi, C.** 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353–1375.

- Foissac, X. & Wilson, M.R.** 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In P.G. Weintraub & P. Jones, eds. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, pp. 309–324. Wallingford, UK, CABI. 331 pp.
- Fránová, J.** 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287–S288.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A. & Batlle, A.** 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513–520.
- Green, M.J., Thompson, D.A. & MacKenzie, D.J.** 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482–485.
- Gundersen, D.E. & Lee, I.-M.** 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.
- Guo, Y.H., Cheng, Z.M. & Walla, J.A.** 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134–1136.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. & Dickenson, M.** 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.
- IPWG (International Phytoplasma Working Group).** n.d. Phytoplasma collection web page. Available at [http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=29&Itemid=5](http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5) (last accessed 17 April 2015).
- IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group).** 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267–275.
- Jarausch, W., Lancas, M. & Dosba, F.** 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47–54.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J. & Dally, E.** 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269–277.
- Kirkpatrick, B.C.** 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-S. Schleifer, eds. *The prokaryotes*, Vol. III, pp. 4050–4067. New York, NY, Springer Verlag.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. & Purcell, A.H.** 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197–199.
- Kreder, C.A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102–1106.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E. & Harrison, N.A.** 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887–2897.
- Lee, I.-M., Davis, R.E. & Gundersen-Rindal, D.E.** 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.

- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. & Bartoszyk, I.M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E.** 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.
- Lim, P.-O. & Sears, B.B.** 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606–2611.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A. & Nicolaisen, M.** 2012. DNA barcoding for identification of ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE*, 7: e52092.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. & Seemüller, E.** 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805–810.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. & Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037–2051.
- Marzachi, C.** 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228–231.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rupar, M., Boben, J., Ravnikar, M. & Dermastia, M.** 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 139–145. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Necas, T. & Krska, B.** 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101–105.
- Oshima, K., Maejima, K. & Namba, S.** 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2013.00230.
- Palmano, S.** 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99–107.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. & Malembic-Maher, S.** 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.
- Pilotti, C.A., Saul, J., Liefting, L.W., Kembu, A. & Kokoa, P.** 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32–40.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M. & Dermastia, M.** 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760–766.
- Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.-M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R. & Barba, M.** 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130–1137.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., Wei, W. & Davis, R.E.** 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2879–2894.
- Schneider, B., Gibb, K.S. & Seemüller, E.** 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.

- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C.** 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In S. Razin & J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Vol. 1, pp. 369–380. San Diego, CA, Academic Press. 483 pp.
- Seemüller, E., Garnier, M. & Schneider, B.** 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In S. Razin & R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, pp. 91–115. New York, NY, Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 pp.
- Seemüller, E., Schaper, U. & Zimbelmann, F.** 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382 (in English with German summary).
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C. & Martin, M.P.** 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334–340.
- Weintraub, P. & Beanland, L.** 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.
- Werren, J.H., Windsor, D. & Guo, L.** 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.
- Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C.** 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45–50.

## 出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2004年11月，标准委增列主题：病毒与植原体（2004-018）

2006年4月，植检委第一届会议增列主题

2013年4月，专家磋商

2013年6月，草案提交给诊断规程技术小组会议

2014年5月，标准委批准提交成员磋商（2014\_eSC\_May\_07）

2014年7月，成员磋商

2015年3月，诊断规程技术小组批准提交给标准委审议批准（2015\_eTPDP\_May\_01）

2015年6月，标准委批准进入诊断规程通报期（2015\_eSC\_Nov\_04）

2015年8月，诊断规程通报期

2015年8月，收到正式反对意见

2015年9月，诊断规程技术小组虚拟会议

2015年10月，诊断规程技术小组分析正式反对意见并作出修改（2015\_eTPDP\_Oct\_03）

2015年11月，标准委批准进入诊断规程通报期并批准对正式反对意见的反馈意见（2015\_eSC\_Nov\_10）

2016年1月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到正式反对意见）

**ISPM 27. 附件 12.** 植原体（2016）。罗马，国际植物保护公约，粮农组织。

出台背景最后更新：2016年4月