

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3629—2020

马铃薯黑胫病菌和软腐病菌 PCR检测方法

Detection of pathogenic bacteria for potato blackleg and
soft rot by PCR method

2020-07-27 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布



本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：黑龙江省农业科学院马铃薯研究所、龙科雪川农业发展(克山)有限公司、农业农村部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)、中国农业大学、西南大学。

本标准主要起草人：魏琪、胡林双、董学志、白艳菊、吕典秋、王晓丹、彭亚清、闵凡祥、宿飞飞、范国权、杨帅、王文重、郭梅、王绍鹏、刘振宇、高云飞、张抒、万书明、刘尚武、张威、邱彩玲、高艳玲。

马铃薯黑胫病菌和软腐病菌 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了马铃薯黑胫病菌和软腐病菌的 PCR 检测方法,其致病菌株主要包括黑腐果胶杆菌(*Pectobacterium atrosepticum*, Pa)、胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, Pcc)和菊迪克氏菌(*Dickeya chrysanthemi*, Dch)3种。

本标准适用于马铃薯试管苗、原原种和田间马铃薯植株、块茎等组织中马铃薯黑胫病菌和软腐病菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

本标准采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法检测马铃薯黑胫病菌和软腐病菌。其原理是:马铃薯黑胫病和软腐病的致病菌基因组包含 4 500 个基因,某些关键区域在进化上较为保守,可代表该病原菌特异性和唯一性,利用致病菌相应的特异性引物,以基因组 DNA 为模板,在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 扩增,根据 PCR 扩增结果判断该样品中是否含有目的片段,从而达到鉴定马铃薯黑胫病菌及软腐病菌的目的。

4 试剂与材料

以下所有试剂,除另有规定外,均使用分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 植物基因组 DNA 提取试剂盒。

4.2 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。

4.3 dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)。

4.4 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})。

4.5 无水乙醇。

4.6 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液。

4.7 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液

量取 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液 20 mL,加水定容至 1 000 mL。

4.8 75%乙醇

量取无水乙醇 75 mL,加水定容至 100 mL。

4.9 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)或 GelRed 核酸凝胶染料(溴化乙锭替代物)

称取溴化乙锭 200 mg,加水溶解,定容至 20 mL。

GelRed 核酸凝胶染料按照商品推荐稀释浓度使用。

4.10 1.0%琼脂糖凝胶板

称取琼脂糖 1.0 g,加入 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液定容至 100 mL,微波炉中加热至琼脂糖融化,待溶液冷却至 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C时,加溴化乙锭溶液或 GelRed 核酸凝胶染料 5 μ L,摇匀,倒入制胶板中均匀铺板,凝固后取下梳子,备用。

4.11 引物缓冲液

用水将上、下游引物分别配制成工作浓度为 10 ng/ μ L 的溶液。

4.12 2 000 bp DNA 分子量标准物。

4.13 6×电泳上样缓冲液。

5 主要仪器

5.1 PCR 仪。

5.2 台式高速离心机(离心力 1 180 g ~12 470 g)。

5.3 电泳仪、水平电泳槽。

5.4 凝胶成像仪。

5.5 移液器(0.1 μL ~2.5 μL 、0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL)。

5.6 灭菌锅等。

6 操作步骤

6.1 对照的设立

试验分别设立阳性对照、阴性对照和空白对照(即用等体积的水代替模板 DNA 作空白对照),在检测过程中要同待测样品一同进行如下操作。

6.2 样品制备

取马铃薯试管苗、茎、块茎维管束组织或发病组织 0.1 g,现用现取或 4℃ 条件下保存(少于 7 d)。

6.3 DNA 提取

6.3.1 植物组织样品 DNA 提取

将样品置于研钵中,加液氮研磨成粉末,转至 1.5 mL 离心管。后续操作参见植物基因组 DNA 提取试剂盒推荐步骤进行。

6.3.2 菌株样品 DNA 提取

菌株水溶液经 4 000 r/min 离心后,弃掉上清液,留沉淀。后续操作参见植物基因组 DNA 提取试剂盒推荐步骤进行。

6.4 PCR 扩增

6.4.1 PCR 扩增引物

上、下游引物为 *Pa*、*Pcc*、*Dch* 的特异性引物,见附录 A。

6.4.2 PCR 反应体系

按表 1 顺序加入相应试剂(缩略语见附录 B),混匀,离心 10 s,使液体都沉降到 PCR 管底。

表 1 PCR 扩增反应体系

试剂名称	每个反应中加入量, μL
水	16.3
10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5
dNTP 混合物	4.0
上游引物(10 μmol)	0.5
下游引物(10 μmol)	0.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.2
样品量(DNA)	1.0
总体积	25.0

6.4.3 PCR 反应程序

按表 2 列出的每对引物反应程序分别进行 PCR 扩增。

表 2 每对特异性引物的 PCR 扩增反应程序

引物名称	第一步	第二步	第三步
ECA1f	94℃, 5 min	循环 36 次:94℃, 30 s;62℃, 45 s;72℃, 45 s	72℃, 7 min
ECA2r			
EXPCCF	94℃, 5 min	循环 30 次:94℃, 60 s; 60℃, 1 min; 72℃, 2 min	72℃, 7 min
EXPCCR			
ADE1	94℃, 5 min	循环 25 次:94℃, 60 s; 72℃, 2 min	72℃, 7 min
ADE2			

7 琼脂糖凝胶电泳

使用 1.0% 的琼脂糖凝胶板,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA 分子量标准物作为分子量标记,进行凝胶电泳。电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察,凝胶上是否出现预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

8 结果

8.1 试验成立的条件

阳性对照检测到预期大小的特异性扩增条带,阴性对照和空白对照均没有检测到预期大小的目的条带。若阴性对照、阳性对照和空白对照同时成立时,则表明试验有效,否则试验无效。

8.2 阳性判定

待检样品若在 690 bp 对应位置出现特异性条带,则判定样品为 *Pa* 阳性;待检样品若在 550 bp 对应位置出现特异性条带,则判定样品为 *Pcc* 阳性;待检样品若在 420 bp 对应位置出现特异性条带,则判定样品为 *Dch* 阳性。

8.3 阴性判定

待检样品若在 690 bp 对应位置未出现特异性条带,则判定样品为 *Pa* 阴性;待检样品若在 550 bp 对应位置未出现特异性条带,则判定样品为 *Pcc* 阴性;待检样品若在 420 bp 对应位置未出现特异性条带,则判定样品为 *Dch* 阴性。

附 录 A
(规范性附录)
黑胫病和软腐病致病菌的特异性引物序列

黑胫病和软腐病致病菌的特异性引物序列见表 A. 1。

表 A. 1 黑胫病和软腐病致病菌的特异性引物序列

引物名称	引物序列(5'~3')	片段长度	病原菌名称
ECA1f ^a	CGG CAT CAT AAA AAC ACG	690 bp	<i>Pa</i>
ECA2r ^b	GCA CAC TTC ATC CAG CGA		
EXPCCF ^a	GAA CTT CGC ACC GCC GAC CTT CTA	550 bp	<i>Pcc</i>
EXPCCR ^b	GCC GTA ATT GCC TAC CTG CTT AAG		
ADE1 ^a	GAT CAG AAA GCC CGC AGC CAG AT	420 bp	<i>Dch</i>
ADE2 ^b	CTG TGG CCG ATC AGG ATG GTT TTG TCG TGC		
注:a 代表病原菌的上游引物,b 代表病原菌的下游引物。引物参考文献如下: SONIA N. HUMPHRIS, GREIG CAHILL, JOHN G. ELPHINSTONE, et al, 2015. Detection of the Bacterial Potato Pathogens <i>Pectobacterium</i> and <i>Dickeya</i> spp. Using Conventional and Real-Time PCR[M]//Christophe L. Plant Pathology: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1302:1-16.			

附 录 B
(规范性附录)
缩 略 语

下列缩略语适用于本文件:

Pa:黑腐果胶杆菌(*Pectobacterium atrosepticum*);

Pcc:胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*);

Dch:菊迪克氏菌(*Dickeya chrysanthemi*);

dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate);

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

Taq DNA 聚合酶:嗜热菌 DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase);

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。



中华人民共和国
农业行业标准

马铃薯黑胫病菌和软腐病菌 PCR 检测方法

NY/T 3629—2020

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2020 年 10 月第 1 版 2020 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 8179

定价: 18.00 元



NY/T 3629—2020

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261