

胡椒瘟病病原物分子检测技术规程

Technical code for pathogen molecular detection of pepper Phytophthora foot rot

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1	1
4 检测方法	1
4.1 原理	1
4.2 主要器材	1
4.2.1 主要仪器	1
4.2.2 主要器具和耗材	1
4.2.3 主要试剂及配制方法	1
4.2.3.1 DNA 提取缓冲液	2
4.2.3.2 PCR 反应液	2
4.3 操作步骤	2
4.3.1 样品采集	2
4.3.2 样本 DNA 制备	2
4.3.2.1 待检样本 DNA 制备	2
4.3.2.2 对照样本 DNA 制备	2
4.3.3 PCR 反应	2
4.3.4 PCR 产物检测	2
5 结果判定	3
6 结果记录	3
7 样品处理	3
附录 A (资料性) 胡椒瘟病病原菌分子检测报告表	4
A.1 胡椒瘟病病原菌分子检测报告表	4
附录 B (资料性) PCR 产物电泳图谱	5
B.1 PCR 产物电泳图谱	5

前 言

本文件按照GB/T 1.1—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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由海南省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院香料饮料研究所

本文件主要起草人：高圣风、王亚男、苟亚峰、孙世伟、刘世超、杨建峰、田甜、温思为

胡椒瘟病病原物分子检测技术规程

1 范围

本标准规定了胡椒瘟病病原菌 (*Phytophthora capsici*) 的术语和定义、检测方法、结果判定、结果记录、样品保存。

标准适用于胡椒瘟病病原菌的分子检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 3816-2020 热带作物病虫害监测技术规程 胡椒瘟病

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胡椒瘟病 pepper *Phytophthora* foot rot

由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 引起的胡椒卵菌病害，又称胡椒基腐病。

4 检测方法

4.1 原理

根据胡椒瘟病病原菌三磷酸鸟苷 (GTP) 结合蛋白基因 (*Ypt1*) 保守区域设计特异性引物进行PCR扩增。依据是否扩增获得预期230 bp的DNA片段，判断样品中是否携带胡椒瘟病病原菌。

4.2 主要器材

4.2.1 主要仪器

手持式组织研磨器、台式离心机、PCR 检测仪、电泳仪、凝胶成像仪等

4.2.2 主要器具和耗材

剪刀、镊子、样品密封容器、1.5 ml离心管、一次性研磨杵、移液器、吸头、PCR管等，其中接触样品的器材应是洁净无菌的。

4.2.3 主要试剂及配制方法

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯。

4.2.3.1 DNA 提取缓冲液

在900 mL去水中加入1.46 g 氯化钠、2.42 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、20 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-40)、0.73 g 乙二胺四乙酸 (EDTA)、0.5 g 十二烷基硫酸钠 (SDS)，用1 mol/L盐酸调整pH至8.0，定容至1 000 mL。室温保存。

4.2.3.2 PCR 反应液

用PCR预混试剂、引物、样品DNA等配制，或者用耐热DNA聚合酶、PCR缓冲液、氯化镁、dNTPs、引物、样品DNA等配制。方法参照PCR产品说明书。现配现用。

4.3 操作步骤

4.3.1 样品采集

按照NY / T 3816-2020进行田间诊断，选择带有疑似症状植株的病健交界部位，采集长度为5 cm~10 cm的主蔓或叶片。样品应放入密闭容器内，室温存放时间不宜超过48 h，长期保存应置于-70 ℃及以下温度环境。将取样结果进行记录，记录表格见附录A。

4.3.2 样本 DNA 制备

4.3.2.1 待检样本 DNA 制备

取30 mg~50 mg病健交界处组织，剪碎后放入1.5 ml的离心管中。加入500 μl DNA提取缓冲液，用手持式组织研磨器研磨成匀浆。10000 ×g离心2 min，将上清液转移至新的1.5 ml离心管中，即为DNA模板。冷藏贮存不宜超过3 h，长期保存应在热处理（80 ℃，5 min）后置于-20 ℃及以下温度环境。

4.3.2.2 对照样本 DNA 制备

以人工接种发病的胡椒叶片为阳性对照、以健康叶片为阴性对照。DNA制备方法同4.3.2.1。

4.3.3 PCR 反应

配制25 μL PCR反应液，其中DNA模板、上游引物和下游引物添加量均为1 μL。检测用特异引物序列及使用方法见表1。扩增程序为：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 sec，55 ℃退火30 sec，72 ℃延伸30 sec，35 个循环；72 ℃延伸7 min。

表 1 检测用特异引物

引物名称	引物序列	引物浓度	预期产物长度
上游引物	5'-GACGTTTTAGTTAGAGCAC-3'	10 μmol/L	230 bp
下游引物	5'-AATGGCACTGAAGTTCTG-3'		

4.3.4 PCR 产物检测

选择DL2 000 DNA Marker或50 bp DNA Ladder等包含200 bp或250 bp条带的DNA分子量标准。用1%琼脂糖凝胶电泳分离（电压为8 V/cm）。DNA分子量标准和PCR产物的添加量均为10 μL/孔，添加顺序参照附录B。当溴酚蓝条带迁移至凝胶2/3位置时结束电泳，于凝胶成像仪紫外灯下检测PCR产物条带。

5 结果判定

检测结果判定见表2。

表 2 检测结果判定表

判定条件				结果
PCR产物在230bp处是否有条带出现（见附录B）				
序号	阳性对照	阴性对照	待检样品	
1	是	否	是	阳性，待检样品携带胡椒瘟病病原菌
2	是	否	否	阴性，待检样品不携带胡椒瘟病病原菌
3	否	是/否	是/否	检测结果无效
4	是/否	是	是/否	

6 结果记录

检测结果按附录表A.1填写，并做好档案保存。

7 样品处理

鉴定为带有胡椒瘟病病原菌的样品应保存90 d，以备复核。保存期满后须进行灭活处理。

附录 A

(资料性)

胡椒瘟病病原菌分子检测报告表

A.1 胡椒瘟病病原菌分子检测报告表

胡椒瘟病病原菌分子检测报告表见表A.1

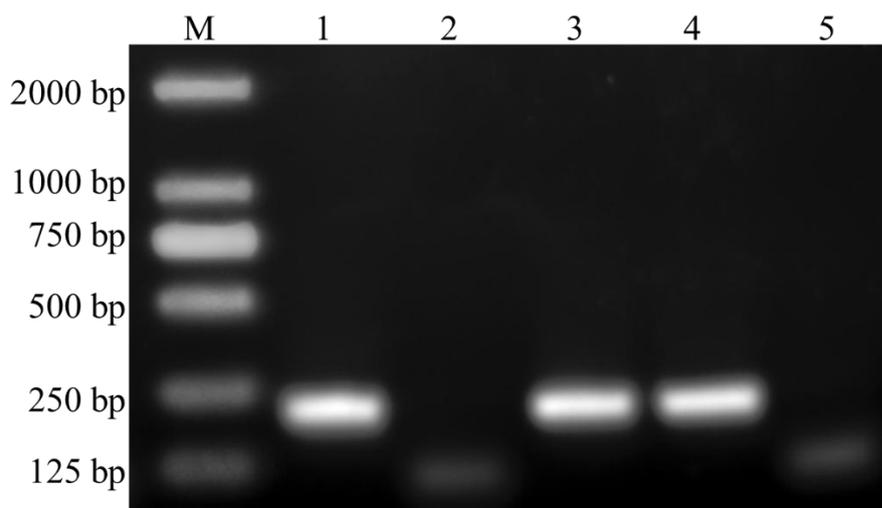
表 A.1 胡椒瘟病病原菌分子检测报告表

送检日期		采样时间	
送检人		采样地点	
联系电话		样品数量	
送检单位		收样人	
检测方法：			
检测结果：			
备注：			
检测人（签名）：			
审核人（签名）：			
检测单位（盖章）：			
年 月 日			
注：本单一式两联，第一联送检单位存档，第二联检测单位存档。			

附录 B
(资料性)
PCR 产物电泳图谱

B.1 PCR 产物电泳图谱

PCR产物电泳图谱见图B.1



标引序号说明:

M——DNA分子量标准;

1——阳性对照;

2——阴性对照;

3~4——阳性样品;

5 ——阴性样品。

图 B.1 PCR 产物电泳图谱