

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 226—2021

水稻种子携带细菌性条斑病菌和细菌性谷 枯病菌同步分子检测规程

Technical regulations for simultaneous molecular-detection of
Xanthomonas oryzae pv. *oryzicola* and *Burkholderia glumae* and from rice
seeds

2021-09-13 发布

2021-09-20 实施

广西标准化协会 发 布

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可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西壮族自治区农业科学院水稻研究所提出。

本文件起草单位：广西壮族自治区农业科学院水稻研究所。

本文件主要起草人：马增凤、黄大辉、陈小林、秦钢、张月雄、刘驰、韦敏益、李振经。

水稻种子携带细菌性条斑病菌和细菌性谷枯病菌同步分子检测规程

1 范围

本文件确立了同步检测水稻种子携带细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*(Xcola))和细菌性谷枯病菌(*Burkholderia glumae*)多重PCR技术(multiplex PCR)的程序,界定了所涉及的术语和定义,给出了原理、仪器设备及试剂、培养基和溶液配制的信息,描述了抽样、样品处理及分离方法、多重PCR检测、结果判定、样品及用具处理等阶段的操作指示。

本文件适用于广西行政区域内水稻种子中细菌性条斑病菌和细菌性谷枯病菌的同步分子检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 15569 农业植物调运检疫规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水稻细菌性条斑病 bacterial leaf streak of rice

由稻黄单胞菌稻生致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*(Fang et al.) Swing et al.)引起的细菌性病害。

[来源:GB/T 28099-2011, 3, 有修改]

3.2

水稻细菌性谷枯病 bacterial grain rot of rice

由颖壳假单胞菌(*Burkholderia glumae*(Kurita&Tabei) Urakami et al.)引起的细菌性病害。

[来源:GB/T 29396-2012, 3, 有修改]

3.3

阳性对照 positive control

以水稻细菌性条斑病菌和水稻细菌性谷枯病菌的DNA作为检测的阳性对照。

3.4

阴性对照 negative control

以超纯水作为检测的阴性对照。

3.5

多重PCR技术 multiplex PCR

多种病原微生物同时检测或鉴定的技术,是在同一PCR反应管中同时加上多种病原微生物的特异性引物,进行PCR扩增,可用于同时检测多种病原菌。

4 原理

针对水稻细菌性条斑病菌病原菌的*LPSO-antigen biosynthesis protein*基因的保守区域以及水稻细菌性谷枯病菌病原菌的*gyrB*基因的保守区域,设计特异性引物,对待检样品进行PCR扩增,依据是否扩增获得预期DNA片段,从而准确快速地从稻种检测出病原菌。

5 仪器设备及试剂

应符合附录A的规定。

6 培养基和溶液配制

应符合附录B的规定。

7 抽样

水稻种子抽样可参照GB 15569 6.2方法进行。

8 样品处理及分离培养

8.1 样品处理

待检水稻种子取20粒于灭菌的研钵中加入液氮进行研磨，再加入5 mL灭菌的磷酸缓冲液制成提取液，在25℃下放置5 h后涡旋5 min混匀，再加入灭菌的磷酸缓冲液稀释成100倍的悬浮液。

8.2 分离培养

取100 μL悬浮液在NA培养基平板上划线分离，在28℃培养箱内培养50 h。

9 多重PCR检测

9.1 样品制备

将平板上的菌落用5 mL无菌水洗脱，制成细菌悬浮液。

9.2 引物的设计与序列

引物信息见附录C。

9.3 PCR反应体系

PCR反应体系（20 μL）：2×PCR Taq Master Mix 8 μL，2对正反向引物（10 mmol/L）各0.5 μL，灭菌水10 μL，1 μL的细菌悬浮液。以无菌水作对照。

9.4 PCR反应条件

94℃预变性5 min；94℃变性30 s，52.5℃退火30 s，72℃延伸5 min，循环30次；72℃延伸10 min，4℃保存。

9.5 加样与电泳

采用琼脂糖凝胶电泳方法，将制备好的琼脂糖凝胶放入电泳槽中，用10 μL微量移液器吸取5 μL扩增产物缓慢加入加样孔中。加样后，盖上电泳槽盖子，连接电源，设定电压为100 V，历时1 h，运行仪器。当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约2 cm时，停止电泳。

9.6 凝胶成像分析

电泳结束后，用溴化乙锭染色20 min，将凝胶取出置于紫外凝胶成像仪中，曝光200 s，观察结果并拍照保存。

10 结果判定

10.1 阳性反应

观察电泳结果，阳性对照在412 bp和690 bp处有条带出现，且阴性对照无条带出现的前提下，待测样品在412 bp和690 bp处有条带出现，判断样品携带水稻细菌性条斑病菌和水稻细菌性谷枯病菌。

10.2 阴性反应

观察电泳结果，阳性对照在412 bp和690 bp处有条带出现，且阴性对照无条带出现的前提下，待测样品在412 bp和690 bp处无条带出现，判断样品不携带水稻细菌性条斑病菌和水稻细菌性谷枯病菌。

11 样品及用具处理

检测过程中使用的有关材料和用具，在使用完毕后应进行消毒处理和除害处理，经检验鉴定后的种子样品，应在-80℃~-20℃保存三个月，保存期满后，再进行灭活处理。



附 录 A
(规范性)
主要仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 超净工作台。
- A.1.2 高压灭菌锅。
- A.1.3 生物显微镜。
- A.1.4 PCR扩增仪。
- A.1.5 高速冷冻离心机：最大离心力不小于15 000 g。
- A.1.6 紫外凝胶成像仪。
- A.1.7 普通电泳仪。
- A.1.8 旋涡混匀器。
- A.1.9 冰箱：最低温度-20 ℃。
- A.1.10 水浴锅：控温精度±1 ℃。
- A.1.11 电子天平：感应为0.001g。
- A.1.12 微量移液器：规格分别为10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL，连续可调。
- A.1.13 培养箱：(28±1) ℃。
- A.1.14 培养皿。
- A.1.15 三角瓶。
- A.1.16 剪刀。
- A.1.17 离心管。

A.2 主要试剂

- A.2.1 除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水应符合GB/T 6682中一级水的规格。
- A.2.2 三羟基氨基甲烷 (Tris)。
- A.2.3 三羟基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl)。
- A.2.4 乙二胺四乙酸 (EDTA)。
- A.2.5 氯化钠 (NaCl)。
- A.2.6 氢氧化钠。
- A.2.7 十二水合磷酸二氢钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- A.2.8 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。
- A.2.9 氯化钾 (KCl)。
- A.2.10 浓盐酸。
- A.2.11 DNA分子量标准 (Marker)。
- A.2.12 2×PCR Taq Master Mix。
- A.2.13 核酸染色剂。
- A.2.14 无水乙醇。
- A.2.15 硼酸。
- A.2.16 蛋白胨。
- A.2.17 牛肉浸膏。
- A.2.18 琼脂糖。

附录 B
(规范性)
培养基和溶液配制

B.1 NA 培养基

蛋白胨5 g, 牛肉浸膏3 g, 琼脂18 g, 加蒸馏水至1 000 mL, pH6.8~7.0, 121 °C 高压灭菌15 min。

B.2 NB 培养液

蛋白胨5 g, 牛肉浸膏3 g, 加蒸馏水至1 000 mL, pH6.8~7.0, 121 °C 高压灭菌15 min。

B.3 磷酸缓冲液

8 g NaCl, 2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 , 0.2 g KCl, 加蒸馏水至1 000 mL。

B.4 0.5 mol/L HCl

25 mL浓盐酸加水定容至500 mL。

B.5 0.5 mol/L EDTA

186.1 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于800 mL水中, 用固体氢氧化钠调pH至8.0, 定容至1 000 mL, 高压灭菌。

B.6 1 mol/L Tris-HCl

60.55 g Tris碱溶于适量水中, 加HCl调pH至8.0, 定容至500 mL, 高压灭菌。

B.7 TE-缓冲液

1 mol/L Tris-HCl 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 1 mL, 加0.5 mol/L HCl调pH至8.0, 定容至500 mL。

B.8 电泳缓冲液 5×TBE

Tris 54 g, 硼酸27.5 g, 0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 20 mL, 加蒸馏水至1 000 mL, 使用时稀释10倍, 为0.5×TBE。

B.9 琼脂糖凝胶

称取0.5 g琼脂糖, 置于250 mL三角烧瓶中, 加入50 mL 0.5×TBE稀释缓冲液, 盖上封口膜, 放入微波炉加热, 不时摇动, 至琼脂糖全部溶化, 溶液呈透明后冷却至60 °C, 摇匀, 即为1%琼脂糖胶液。

附录 C
(资料性)
引物信息

C.1 引物的设计与序列

C.1.1 水稻细菌性条斑病特异性引物

针对水稻细菌性条斑病病原菌的LPS0-antigen biosynthesis protein基因的保守区域,设计特异性引物:

- 正向引物: 5' -TCTCCCAGCATGTTGATCG-3' ;
- 反向引物: 5' -GCGTTCAATCTCCTCCATGT-3' ;
- 扩增产物为 690 bp。

C.1.2 水稻细菌性谷枯病特异性引物

从GenBank收集并选取水稻细菌性谷枯病菌的部分核酸序列,运用生物软件DNASar分析比较,选取病菌的特异性序列设计并合成特异性引物:

- 正向引物: 5' -ACACGGAACACCTGGGTA-3' ;
- 反向引物: 5' -TCGCTCTCCCGAAGAGAT-3' ;
- 扩增产物为 412 bp。

参 考 文 献

- [1] GB/T 28099-2011 水稻细菌性条斑病菌的检疫鉴定方法
 - [2] GB/T 29396-2012 水稻细菌性谷枯病菌检疫鉴定方法
-



中华人民共和国团体标准
水稻种子携带细菌性条斑病菌和细
菌性谷枯病菌同步分子检测规程
T/GXAS 226—2021
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究

团 体 标 准 公 告

2023 年第 87 号（总第 212 号）

关于批准发布 T/GXAS 226—2021《水稻种子携带细菌性条斑病菌和细菌性谷枯病菌同步分子检测规程》团体标准第 1 号修改单的公告

广西标准化协会批准 T/GXAS 226—2021《水稻种子携带细菌性条斑病菌和细菌性谷枯病菌同步分子检测规程》团体标准第 1 号修改单，自 2023 年 7 月 6 日起实施，现予以公布（见附件）。

附件：T/GXAS 226—2021《水稻种子携带细菌性条斑病菌和细菌性谷枯病菌同步分子检测规程》第 1 号修改单



附件

T/GXAS 226—2021《水稻种子携带细菌性条斑病菌和细菌性谷枯病菌同步分子检测规程》第 1 号修改单

第 7 章抽样中“水稻种子抽样可参照 GB 15569 6.2 方法进行。”修改为“水稻种子抽样可参照 GB 15569-2009 中 6.2 方法进行。”

规范性引用文件中《GB 15569 农业植物调运检疫规程》修改为《GB 15569-2009 农业植物调运检疫规程》。